

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

ANNÉE SCOLAIRE 1958-1959 — SÉRIE E, NUMÉRO 83

LES ANTIGÈNES TRÉPONÉMIQUES DANS LE SÉRO-DIAGNOSTIC DE LA SYPHILIS

THÈSE

pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT D'ÉTAT EN PHARMACIE

Présentée et soutenue le 15 janvier 1959

par

ANNETTE HAMELIN

Pharmacien

Licenciée ès sciences

JURY :

Mlle S. LAMBIN, *présidente* ;

MM. A. GERMAN, *professeur* ;

R. CAVIER, *professeur*.

PARIS

LIBRAIRIE LE FRANÇOIS, 91, BOULEVARD SAINT-GERMAIN

1959



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545908_0049

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

ANNÉE SCOLAIRE 1958-1959 — SÉRIE E, NUMÉRO 83

LES ANTIGÈNES TRÉPONÉMIQUES DANS LE SÉRO-DIAGNOSTIC DE LA SYPHILIS

THÈSE

pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT D'ÉTAT EN PHARMACIE

Présentée et soutenue le 15 janvier 1959

par

ANNETTE HAMELIN

Pharmacien

Licenciée ès sciences

JURY :

Mlle S. LAMBIN, *présidente ;*

MM. A. GERMAN, *professeur ;*

R. CAVIER, *professeur.*



PARIS

LIBRAIRIE LE FRANÇOIS, 91, BOULEVARD SAINT-GERMAIN

1959

PERSONNEL DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS

ADMINISTRATION

René FABRE	Doyen, membre de l'Institut C ✱, Q C.
M. JANOT	Assesseur, ✱, Q I.
C. CUVIER	Secrétaire général ✱, Q I.
L. JEANDEL	Secrétaire, Q I.

Doyen honoraire : M. RADAIS, C. ✱, Q C.

PROFESSEURS HONORAIRES

DELÉPINE, C. ✱, Q I. et LEBEAU, C. ✱, Q C., membres de l'Institut.
HERISSEY, C. ✱, Q I. ; LAUNOY, O. ✱, Q I. ; FLEURY, O. ✱, Q I. ;
MASCRC, C. ✱, Q I. ; PICON, O. ✱, Q I.

PROFESSEURS

R. FABRE.....	membre de l'Institut, C. ✱, Q C.; Toxicologie (T.).
M. JANOT	✱, Q I. - Pharmacie Galénique (T.).
G. VALETTE	✱, Q I. - Pharmacodynamie (T.).
C. BEDEL.....	✱, Q I., Législation, Déontologie et Histoire de la Pharmacie (T.).
R. PARIS.....	✱, Q I. - Histoire naturelle, des médicaments simples d'origine végétale (T.).
M. GUILLOT.....	✱, Q I. - Physique (T.).
J. GAUTIER.....	✱, Q I. - Chimie organique (T.).
Mlle S. LAMBIN ..	✱, Q I. - Microbiologie (T.).
Y. RAOUL.....	Q I. - Zoologie appliquée (T.).
J. COURTOIS	✱, Q I. - Chimie biologique (T.).
L. DOMANGE	✱, Q I. - Chimie minérale (T.).
P. CRÉTÉ	✱, Q I. - Botanique (T.).
R. TRUHAUT	✱, Q I. - Toxicologie et Hygiène industrielle (T. P.).
A. MORETTE	✱, Q I. - Hydrologie (T.).
R. CAVIER	Q I. - Parasitologie (T. P.).
A. QUEVAUVILLER.	Q I. - Hygiène (T.).
R. MOREAU.....	✱, Q I. - Chimie analytique (T.).
J. GUY	Q A. - Mathématiques appliquées aux sciences physiques et biolo- giques (T. P.).
A. GERMAN.....	Q A. - Technique bactériologique
M. PIETTE.....	Q I. - Biologie sanguine.
N.....	- Pharmacie chimique (T.).

MAITRES DE CONFÉRENCES

G. DEYSSON	Q A. - Cryptogamie.
P. MALANGEAU...	- Biochimie.
J. FLAHAUT.....	- Minéralogie.
J. RENAULT.....	- Chimie organique.
G. DILLAMANN ..	- Biologie végétale.
M. GIRARD	Q A. - Chimie analytique.
P. LARUELLE.....	- Physique.
G. LE MOAN	- Toxicologie.
P. ROSSIGNOL	- Pharmacodynamie.
N.....	- Pharmacie galénique.
N.....	- Pharmacie chimique.

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES

J. BORY.....	- Sérologie.
P. CORRIEZ.....	Q I. - Physique.
A. DESVIGNES ...	Q A. - Microbiologie.
J. GARDENT	- Chimie analytique (1 ^{re} année).
P. GESTEAU.....	✱, Q I. - Physique biologique.
J. HARISPE	Q I. - Chimie générale et pharma- ceutique.
J. HENRY	- Chimie analytique (2 ^e et 3 ^e an- nées).
M. LECLERC	Q A. - Chimie biologique.
Mlle S. LONGUE- VALLE	Q I. - Service des examens de chimie.
F. PELLERIN	- Chimie analytique (2 ^e et 3 ^e an- nées).
F. PERCHERON ..	- Chimie (4 ^e année).
R. POTTIER	Q A. - Pharmacie galénique in- dustrielle.
Mlle A. ROLLEN .	✱, Q A. - Biologie végétale.
J. SAVEL.....	- Parasitologie.

INSTITUT DE PHARMACOTECHNIE ET DE PHARMACODYNAMIE

R. GOUTAREL ...	Q A. - Chef de travaux de Phar- macotechnie galénique.
Mlle H. MORIN .	Q A. - Chef de travaux de Phar- macodynamie.
X. LUSINCHI....	- Chef de travaux de Pharmaco- technie galénique.

BIBLIOTHÈQUE

GARNIER	✱, Q I. - Conservateur, chargé de la Direction.
Mlle LAVAUD....	Q I. - Conservateur.
Mme DESGRIPPES.	Q A. { Bibliothécaires.
Mme KREHMER..	Q A. {

A Mademoiselle le professeur S. LAMBIN

Professeur de Microbiologie et Cryptogamie à la Faculté
de Pharmacie de Paris
Chevalier de la Légion d'honneur

*qui nous a fait l'insigne honneur de nous
confier ce travail et de présider le Jury de
cette thèse.*

*En témoignage de profonde gratitude et de
sincère reconnaissance.*

A Monsieur le professeur CAVIER

Professeur à la Faculté de Pharmacie de Paris

qui a accepté de juger ce travail.

En témoignage de respectueuse gratitude.

A Monsieur le professeur GERMAN

Professeur à la Faculté de Pharmacie de Paris

*qui nous initia à la bactériologie et nous fait
l'honneur de faire partie de notre Jury de
thèse.*

*Pour lui exprimer nos remerciements et
notre sincère reconnaissance.*

A Monsieur le docteur A. TOURAINE

Président de la Ligue nationale contre le péril vénérien
Membre de l'Académie de Médecine
Commandeur de la Légion d'honneur

Nous le remercions de l'intérêt qu'il porte à nos travaux et nous le prions de croire à notre dévouée et respectueuse reconnaissance.

A Monsieur le docteur SICARD DE PLAULOLES

Directeur général de l'Institut Alfred Fournier
Officier de la Légion d'honneur

De simples remerciements nous semblent bien faibles en échange de toute la bienveillance et des encouragements qu'il nous prodigua sans cesse.

Nous l'assurons de notre respectueuse et fidèle gratitude.

A Monsieur le professeur P. GASTINEL

Membre de l'Académie de Médecine
Officier de la Légion d'honneur

Nous le prions d'accepter nos remerciements pour tous les conseils qu'il nous donna et la bienveillance qu'il nous témoigne toujours.

Nous l'assurons de nos sentiments reconnaissants et respectueusement dévoués.

A notre regretté Maître
le professeur C. LEVADITI

qui nous accueillit dans son service, nous initia et guida dans le domaine de la recherche et à qui nous devons la plus grande part de tous nos travaux.

A Monsieur le docteur A. VAISMAN

Directeur du Laboratoire de Sérologie et Chimiothérapie
de l'Institut Alfred Fournier

Nous lui adressons nos plus grands remerciements pour les précieux enseignements qu'il nous prodigue sans cesse, pour nous avoir fait profiter de sa grande expérience et pour son étroite collaboration. Le dévouement et l'amitié qu'il nous témoigne ont été pour nous l'aide la plus efficace qui fût pour mener à bien ce travail.

En témoignage de notre ineffable reconnaissance et de notre très grande affection.

A MA MÈRE

(*in memoriam*)

Le pieux souvenir qu'elle nous a laissé sera pour nous un modèle de bonté, d'amour et de dévouement.

A MON PÈRE

qui a sacrifié pour nous toute une page de sa vie et nous a offert le bel exemple d'une vie laborieuse et droite, empreinte de la plus grande bonté.

En faible témoignage de notre immense affection.

A MON FRÈRE

le docteur Robert HAMELIN

à qui nous devons beaucoup dans tous les domaines et que nous remercions de tous les conseils éclairés qu'il nous prodigua. Son dynamisme et ses belles qualités de clinicien n'ont d'égale que sa grande modestie.

Qu'il trouve ici l'expression de notre plus grande tendresse.

A MA BELLE-SŒUR

Nous savons apprécier l'accueil spontané et affectueux qu'elle nous réserva dans son foyer et nous ne saurions trop la remercier de cette bonté qui fut pour nous une aide autant matérielle que morale.

Nous l'unissons, elle et notre frère, dans la même affection.

A Madame S. HAMELIN

pour la remercier de tout le dévouement qu'elle nous a prodigué.

En témoignage de notre grande affection.

A Monsieur et Madame Louis DOIGNON

qui nous ont toujours considérée comme leur fille, et auxquels nous ne saurons jamais dire combien nous leur devons de reconnaissance et d'affection.

MEIS et AMICIS

PLAN DU TRAVAIL

INTRODUCTION.

PREMIÈRE PARTIE

LE TEST D'IMMOBILISATION DES TRÉPONÈMES

Contribution personnelle à son étude expérimentale et clinique

- CHAPITRE I. — Principe, technique et études des divers éléments de la réaction.
- CHAPITRE II. — Étude expérimentale de la réaction.
- CHAPITRE III. — Le test d'immobilisation en syphilis expérimentale et en clinique humaine.

DEUXIÈME PARTIE

LES AUTRES RÉACTIONS UTILISANT DES ANTIGÈNES TRÉPONÉMIQUES

- CHAPITRE IV. — La réaction d'adhérence - disparition des tréponèmes.
- CHAPITRE V. — Les réactions d'agglutination des tréponèmes.
- CHAPITRE VI. — Les antigènes tréponémiques fournis par la souche REITER (Recherches personnelles).
- CHAPITRE VII. — Utilisation de *Treponema pallidum* pathogène en tant qu'antigène pour la réaction de fixation de complément (Travail personnel).
- CHAPITRE VIII. — Les tests cutanés dans le diagnostic de la syphilis-Luotest.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

INTRODUCTION

La syphilis, maladie connue depuis presque cinq cents ans par ses manifestations cliniques, est aujourd'hui encore, une des infections des plus répandues et des plus étudiées. Elle pénétra au laboratoire au début de notre siècle et depuis plus de cinquante ans, elle est l'objet de recherches assidues autant que fructueuses.

La première étape, dans le domaine expérimental, fut franchie en 1903, par Metchnikoff et Roux. Ceux-ci, reprenant les essais antérieurs isolés et irréguliers de : Nicolle, Hamonic, Sperck, Neisser, Thibierge et Ravaut, Finger et Landsteiner, annonçaient dans un premier mémoire, le 28 juillet 1903 [29], qu'ils étaient arrivés à provoquer l'apparition d'un chancre induré chez un chimpanzé, 25 jours après l'inoculation de « virus syphilitique » dans le pli du prépuce clitoridien, lésion accompagnée d'adénopathie inguinale satellite, puis, en son temps, d'une éruption de syphilitides papuleuses secondaires.

Le 3 mars 1905, Schaudinn et Hoffmann [30] découvraient, dans une papule syphilitique la *Spirochaeta pallida*, et dès lors, grâce à la découverte de l'agent causal de cette infection, la syphilis devait bénéficier des mêmes procédés d'étude, des mêmes méthodes de diagnostic que les autres affections microbiennes.

En 1906, deux données essentielles se firent jour : d'une part, l'utilisation de l'ultramicroscope pour la recherche de *Treponema pallidum*, par Landsteiner et Mucha [31] et par Hoffmann [32], d'autre part, l'application à la syphilis par Wassermann, Neisser et Bruck [33], de la méthode générale de fixation du complément de Bordet et Gengou. Le laboratoire possédait donc, dès lors, deux moyens de diagnostic de la syphilis, l'un *bactériologique*, la recherche et l'identification du tréponème, l'autre *sérologique*, permettant de déceler la présence d'un anticorps dans le sérum et le liquide céphalo-rachidien. Le tréponème ne pouvant pas être cultivé, Wassermann avait eu l'idée de remplacer les cultures microbiennes employées en tant qu'antigène dans la technique de Bordet-Gengou, par une trituration d'organes renfermant une grande quantité de spirochètes, en particulier, le foie des hérédosyphilitiques. Mais bientôt, les travaux de Levaditi et Marie, d'une part, et ceux de Landsteiner, d'autre part, montraient que la réaction de Wassermann, qu'on considérait alors comme une méthode spécifique dans le sens immunologique du mot,

c'est-à-dire réaction entre antigène et anticorps correspondant, devait être réduite à une réaction physico-chimique entre des lipides à l'état colloïdal et un principe présent dans les sérums des syphilitiques. En effet, en 1907, Levaditi et Marie [34] presque en même temps que Landsteiner [35], montraient que les extraits d'organes normaux possédaient les mêmes propriétés antigéniques que ceux obtenus à partir des tissus renfermant le spirochète. Allant plus loin encore dans l'étude de ce problème, Levaditi et Yamanouchi [36] montraient que l'antigène était constitué par un lipode soluble dans l'alcool et que l'on pouvait même le remplacer par le taurocholate de soude, le glycocholate de soude, la lécithine ou l'extrait alcoolique de bile.

Les efforts se tournèrent alors vers les cultures de tréponèmes. Bien que l'on n'ait pu réussir à cultiver jusqu'alors *Treponema pallidum* lui-même, un certain nombre d'auteurs obtinrent des résultats assez satisfaisants en utilisant comme antigène des souches de tréponèmes non pathogènes, mais facilement cultivables. Le premier fut Noguchi [37] en 1912, qui obtint une réaction de fixation du complément positive avec un sérum humain syphilitique et comme antigène un extrait aqueux de sa fameuse culture de spirochètes. Ses constatations furent confirmées par Craig et Nichols [38] puis par Kolmer, Williams et Laubach [39]. Mais les résultats les plus intéressants furent obtenus par Gachtgens [40] en 1929, qui utilisait la souche de tréponèmes cultivables *Reiter*; cependant, ces travaux n'eurent pas le retentissement qu'ils méritaient et ce n'est qu'en 1941 que d'Alessandro et l'école italienne [41] reprirent les recherches de Gachtgens, approfondissant le problème par une étude très poussée du spirochète *Reiter*, et de son fonctionnement antigénique.

Nous nous sommes particulièrement intéressé à l'étude de cette question et principalement à la préparation d'un antigène plus sensible et plus stable que ceux jusqu'alors employés. Notre but fut atteint en soumettant les spirochètes à une désintégration ultrasonique. Cet antigène a contribué à faire passer cette réaction dans la pratique courante et c'est un des plus utilisés actuellement. Devant les résultats très satisfaisants donnés par l'action des ultrasons sur les tréponèmes *Reiter*, nous avons appliqué le même procédé à des suspensions de *Treponema pallidum* virulents, provenant d'orchites de lapins syphilités, et là aussi, nous avons obtenu un antigène parfaitement utilisable en réaction de fixation du complément. Ce dernier a l'avantage sur le précédent d'une plus rigoureuse spécificité puisqu'il s'agit de l'agent pathogène de la maladie elle-même.

Mais, dès la découverte du tréponème en 1905, nombre d'auteurs avaient constaté l'aptitude de ce micro-organisme à s'agglomérer dans la profondeur des tissus. Landsteiner et Mucha [42], introduisant l'emploi de l'ultramicroscope pour la recherche du tréponème, avaient pensé à la possibilité d'une séro-agglutination. Cette séro-agglutination fut confirmée, d'une part, par Hoffmann, Landsteiner et Zabolotny, et d'autre part, par Lévy-Bing [43] et par Levaditi [44], mais c'est surtout Touraine [45] en 1912, qui décrit une agglutination stellaire des tréponèmes par les sérums de spécifiques. Il constata en même temps l'immobilisation et la dégénérescence granuleuse de ces parasites, remarque qui devait, dans

l'avenir, aboutir au test d'immobilisation. Récemment, plusieurs techniques d'agglutination ont été proposées, parmi lesquelles celles de Tani, Cain, McLeod et Hardy, mais leurs résultats n'ont pas la valeur du test d'immobilisation des tréponèmes mis au point par Nelson et Mayer en 1949 [46].

Ce test consiste à mettre en contact une suspension de tréponèmes vivants et mobiles avec le sérum suspect, en présence de complément, les spirochètes étant immobilisés s'il s'agit d'un sérum de spécifique.

Dès que cette découverte de Nelson et Mayer fut connue, une grande partie de notre activité à l'Institut Alfred Fournier, sur l'instigation du Professeur Levaditi et de M. Vaisman, fut réservée à l'étude de cette réaction, tant au point de vue pratique que théorique.

Dans le présent travail, nous exposerons :

- Au cours de la première partie, le test d'immobilisation des tréponèmes, sa technique, son étude expérimentale et clinique, chapitre dans lequel nous avons inclus les nombreux travaux personnels que nous avons effectués durant ces huit dernières années.
- Dans la seconde partie, nous étudierons les autres réactions utilisant les antigènes tréponémiques et plus particulièrement les réactions de fixation du complément, soit avec l'antigène *Reiter ultrasoné*, soit avec l'antigène *Nichols ultrasoné*, antigènes préparés selon notre technique personnelle, qui sont d'un emploi facile et donnent des résultats très satisfaisants.

Avant de passer à l'exposé détaillé de nos recherches, qu'il nous soit permis d'exprimer à Mlle le professeur S. Lambin notre profonde reconnaissance pour nous avoir suggéré le sujet de notre thèse, nous avoir accueillie avec tant de bienveillance et guidée si utilement. Nous la remercions du grand honneur qu'elle nous fait en acceptant de présider le jury de cette thèse.

Nous adressons également nos respectueux remerciements à M. le professeur Cavier et M. le professeur German qui nous font l'honneur de nous juger en acceptant de constituer notre jury.

A cette occasion, nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à la direction de l'Institut Alfred Fournier et à son personnel qui ont contribué à faciliter nos recherches.

PREMIÈRE PARTIE

LE TEST D'IMMOBILISATION DES TRÉPONÈMES

Le séro-diagnostic de la syphilis s'est enrichi, en 1949, d'une nouvelle méthode permettant de mettre en évidence dans les sérums des sujets atteints de syphilis et dans les sérums des animaux syphilités, la présence d'anticorps capables d'immobiliser *in vitro* *Treponema pallidum*. Ces anticorps sont totalement différents de ceux qui rentrent en jeu dans les techniques de séro-diagnostic de la syphilis utilisant les antigènes lipidiques (sérologie classique). Cette découverte, due à Nelson et Mayer [46], fut aussitôt confirmée par Magnuson et Thompson [47]. Son importance nous a incité à en entreprendre une vérification expérimentale [1-2] qui, s'étant montrée en tous points satisfaisante et conforme aux données de Nelson, nous engagea à étendre nos investigations que nous poursuivons sans relâche depuis 1950, tant ce problème est passionnant et fécond dans ses résultats.

CHAPITRE PREMIER

PRINCIPE, TECHNIQUE ET ÉTUDES DES DIVERS ÉLÉMENTS DE LA RÉACTION

I. PRINCIPE

La réaction consiste à mettre en contact, en présence de complément, le sérum à examiner avec une suspension de tréponèmes vivants et mobiles provenant des testicules de lapins syphilitisés expérimentalement.

Les sérums de spécifiques déterminent l'immobilisation des tréponèmes, dans un délai de 18 heures, à 35 °C et en anaérobiose, tandis que, dans les mêmes conditions, les sérums normaux ou de malades atteints d'autres affections que la tréponémose ne donnent aucune immobilisation.

II. TECHNIQUE

Nous résumons ici la technique du test d'immobilisation de *Treponema pallidum* (désigné par l'abréviation T.P.I.) telle que nous l'utilisons actuellement [21] et nous reviendrons plus loin sur la préparation de chaque élément de la réaction en indiquant la technique originale de Nelson, les différentes modifications proposées et l'étude des divers facteurs pouvant entrer en jeu dans le phénomène d'immobilisation.

A. Suspension tréponémique.

Des lapins, inoculés par voie intratesticulaire avec la souche Nichols, depuis 8 à 12 jours et porteurs d'orchite tréponémique évoluée depuis 48 heures au maximum, sont saignés à blanc. Les testicules, prélevés stérilement par voie péritonéale, sont immédiatement coupés en tranches de 2 à 3 mm d'épaisseur, et introduits dans le milieu de Nelson dont voici la préparation :

Les solutions de chacun des éléments entrant dans ce milieu sont préparées, stérilisées et conservées séparément. La stérilisation se fait par filtration (sur filtre Seitz), la plupart de ces solutions ne supportant pas la chaleur d'un autoclavage. Le mélange des solutions est fait juste au moment de l'emploi, dans les proportions suivantes :

	<i>pour 100 ml de milieu</i>
— Albumine bovine cristallisée, solution à 5 % dans l'eau physiologique, et neutralisée à pH 7.....	50 ml
— Tampon phosphaté, solution de pH 7.....	15,60 ml
— Thioglycolate de sodium, solution à 1,50 g % dans l'eau distillée	6 ml
— Chlorhydrate de cystéine, solution à 0,63 g % dans l'eau physiologique	3,20 ml
— Glutathion, solution à 1,23 g % dans l'eau physiologique.....	3,20 ml
— Pyruvate de sodium, solution correspondant à 0,69 ml % d'acide pyruvique dans l'eau physiologique.....	1,50 ml
— Bicarbonate de sodium, solution à 1,26 g % dans l'eau distillée	6 ml
— Eau physiologique.....	14,50 ml

On vérifie le pH du milieu ainsi préparé, pH qui doit être sensiblement égal à 7 (neutre).

Le complexe vitaminique, conseillé au début par Nelson [46] s'est révélé comme non indispensable à la survie du tréponème et nous nous dispensons de l'introduire dans le milieu.

Les testicules de lapin sont laissés dans le milieu pendant une à deux heures, en atmosphère de 95 % d'azote et de 5 % de gaz carbonique, à 35 °C et agités pour faciliter la diffusion des tréponèmes. Après décantation et centrifugation pendant cinq minutes à 2 000 t/mn, le liquide clarifié, s'il montre plus de 10 tréponèmes par champ à l'ultramicroscope, est dilué dans du milieu de Nelson pour obtenir cette concentration. Le pourcentage de spirochètes mobiles est, en général, très élevé (90 à 98 %) quand on observe strictement les conditions précitées pour l'orchite du lapin et le milieu de survie.

B. Sérums à examiner.

Le sang est prélevé stérilement par ponction veineuse. Après coagulation, le sérum, séparé par centrifugation, pourra être conservé plusieurs mois à —20 °C et sera inactivé par chauffage à 56 °C juste avant d'être introduit dans la réaction. Il est recommandé que la prise de sang soit faite à jeun pour éviter l'opalescence du sérum, et que le patient ait cessé tout traitement par un antibiotique tréponémicide depuis plusieurs jours au moins.

C. Complément.

On utilise du sérum de cobayes mâles recueilli stérilement ou rendu tel par filtration, à employer frais, ou bien un complément lyophilisé. Ce complément doit être titré au préalable ; en général, le mélange de sérums d'un assez grand nombre d'animaux rentrant dans la proportion de 20 % du volume total de la réaction, fournit un complément suffisamment actif pour qu'il ne soit pas complètement détruit au cours de la réaction et qu'il puisse encore être décelé, après la lecture (soit 20 heures plus tard environ), par addition d'un système hémolytique. Cette épreuve finale d'hémolyse est une sécurité indispensable à vérifier pour tous les tubes-réactions.

afin d'éviter des résultats faussement négatifs par manque de complément ou par un très fort pouvoir anticomplémentaire de certains sérums.

D. Réaction proprement dite.

Chaque sérum à examiner comporte deux tubes :

	<i>Millilitre</i>
1° <i>Tube réaction :</i>	
Suspension de tréponèmes	0,35
Sérum suspect inactivé	0,05
Complément frais	0,10
2° <i>Tube témoin :</i>	
Suspension de tréponèmes	0,35
Sérum suspect inactivé	0,05
Complément chauffé à 56 °C pendant 30 minutes	0,10

Chaque série comporte les témoins suivants :

Témoins-complément frais et complément chauffé à 56 °C.

Témoins-sérum positif connu à différentes dilutions.

Témoin-sérum négatif connu.

On place à l'étuve à 35 °C en atmosphère de 95 % d'azote et 5 % de gaz carbonique.

E. Lecture.

L'immobilisation des tréponèmes se fait d'une manière progressive et lente ; elle débute au minimum 5 heures après la mise en route de la réaction, et atteint, en général, son maximum entre 15 et 18 heures. La lecture ne doit donc pas être faite avant ce délai et notre expérience nous a montré que le moment le plus favorable se situe entre 18 et 24 heures, car, passé ce délai, on risque de ne plus pouvoir doser l'excès de complément. Cette lecture s'effectue par dénombrement au microscope à fond noir, des spirochètes mobiles et immobiles et à l'évaluation du pourcentage d'immobilisation sur un minimum de 50 parasites. Elle ne présente pas de difficultés. En effet, les tréponèmes sont, ou bien complètement immobiles, ou bien animés de mouvements très rapides, la différenciation et la numération étant, de ce fait, très faciles.

Le taux d'immobilisation résulte de la différence entre le pourcentage de tréponèmes mobiles dans le tube témoin et le tube réaction de chaque sérum. Le tube témoin doit montrer au moins 70 % de mobilité. En dessous de ce chiffre, la réaction est considérée comme *non satisfaisante*, du fait de la toxicité du sérum qui peut contenir soit des traces d'antibiotiques, soit, dans des cas exceptionnels, des substances non déterminées ne permettant pas la survie des tréponèmes, et n'ayant aucun rapport avec l'anticorps spécifique.

Le résultat est exprimé par la formule suivante qui définit l'*immobilisation spécifique* (I.S.) du sérum :

$$I.S. = \frac{\% \text{ T. mobiles tube témoin} - \% \text{ T. mobiles tube réaction}}{\% \text{ T. mobiles tube témoin}} \times 100$$



FIG. 1
Inoculation intratesticulaire de tréponèmes.



FIG. 2
Orchite précoce, au 8^e jour après l'inoculation.



FIG. 3
Prélèvement stérile par voie péritonéale des testicules.



FIG. 4
Découpage en tranches du testicule pour la préparation de la suspension tréponémique.

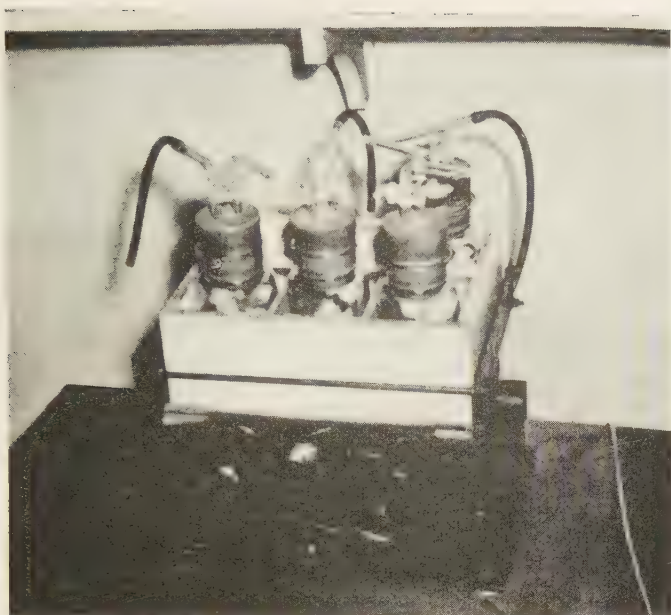


FIG. 5
Agitation des fioles en anaérobiose pour faciliter la diffusion
des tréponèmes dans le milieu.



FIG. 6
Décantation de la suspension tréponémique avant centri-
fugation.

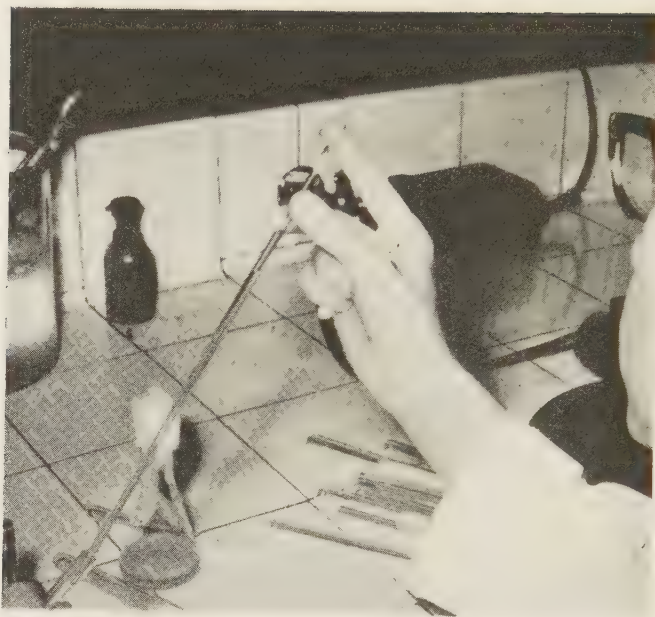


FIG. 7
Distribution de la suspension de tréponèmes dans les tubes de réaction.

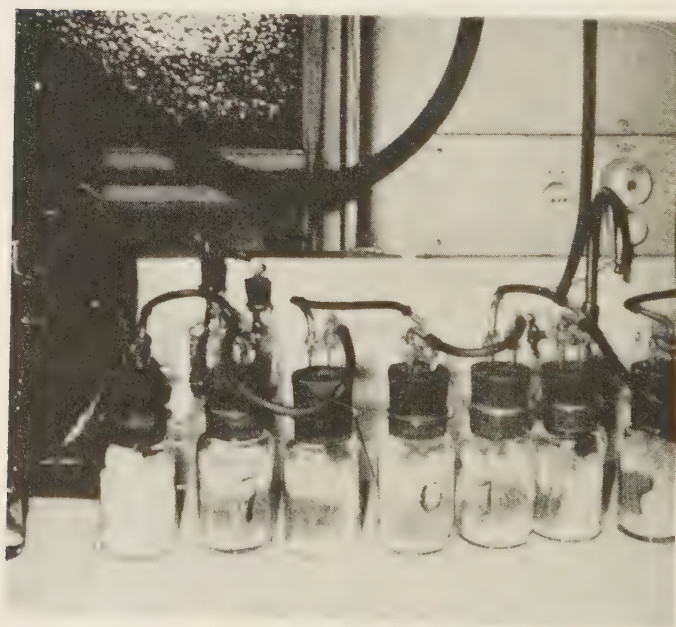


FIG. 8
Montage en série des flacons contenant les tubes réactions pour réaliser le remplacement de l'air ambiant par le mélange :
 $N = 95 \%$ et $CO_2 = 5 \%$.

On considère :

I.S. de 0 à 20 % = réaction négative
 I.S. de 20 à 50 % = réaction douteuse
 I.S. de 50 à 100 % = réaction positive

F. Réactions quantitatives.

Nous venons d'étudier la réaction d'immobilisation des tréponèmes *qualitative* dont les résultats sont exprimés de 0 à 100 %. Mais, la majorité des sérums positifs atteignent facilement ce maximum ; cette échelle de notation n'est donc, en réalité, pas plus étalée que celle employée pour les réactions qualitatives de la sérologie classique avec la notation de négatif à trois croix.

Pour le T.P.I. comme pour la sérologie lipidique, on peut pratiquer des *réactions quantitatives* basées sur le même principe des dilutions progressives du sérum.

L'essentiel de cette réaction quantitative consiste à trouver la dilution du sérum qui donnera 50 % d'immobilisation spécifique. Pour le choix des dilutions de sérum à faire, on peut se baser soit sur les renseignements cliniques ou statistiques, ce qui est hasardeux, soit sur un titrage préalable avec les dilutions 1/100 et 1/1000. On pourra ainsi situer la zone de virage avec plus de précision.

A. Sausse [48] a choisi l'échelle de dilution géométrique de raison :

$$\frac{1}{2,15} = \frac{1}{3 \sqrt{10}}$$

qui se chiffre ainsi :

$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{21,5}$	$\frac{1}{46,5}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{215}$	$\frac{1}{465}$	$\frac{1}{1\ 000}$	$\frac{1}{2\ 150}$	$\frac{1}{4\ 650}$	$\frac{1}{10\ 000}$	etc.
----------------	------------------	------------------	-----------------	-----------------	-----------------	--------------------	--------------------	--------------------	---------------------	------

Considérant que l'immobilisation spécifique est fonction de la concentration en anticorps, cette fonction est représentée par une droite si l'immobilisation est comprise entre 85 et 15 % et si l'on exprime la dilution du sérum par son logarithme. Pratiquement, il se sert d'un papier semi-logarithmique et porte les dilutions en ordonnée, l'immobilisation en abscisse ; avec deux points, on peut ainsi construire une droite, l'optimum étant d'avoir deux points situés de part et d'autre de 50 %. L'ordonnée du point d'intersection de la droite avec la perpendiculaire aux abscisses élevée à 50 % d'immobilisation donnera immédiatement le titre du sérum.

Le sérum, figurant sur le graphique, donnait une immobilisation de 70 % à la dilution 1/46,5 et 20 % à la dilution 1/215. Si l'on trace la droite passant par ces deux points, le 50 % d'immobilisation correspond à la dilution 1/84. L'inverse de cette dilution donne le titre du sérum soit : 84 unités.

Pour notre part, chaque fois qu'un test est demandé quantitatif, nous effectuons, en même temps que le test qualitatif, la réaction sur deux dilutions du sérum, le 1/5 et le 1/50. Si le sérum présente encore plus de 50 % d'immobilisation dans le dernier tube, nous augmentons les

dilutions jusqu'à ce que nous obtenions ce taux. Quand l'immobilisation est de 50 % dans le tube réaction du test qualitatif, le titre en immobilisines est de 10 unités puisque le sérum se trouve dans la proportion du 1/10 du volume total. Le nombre d'unités est exprimé par l'inverse de la dilution du sérum, en tenant compte du volume final du tube qui donne 50 % d'immobilisation spécifique.

III. ÉTUDES des DIVERS ÉLÉMENTS de la RÉACTION

A. Préparation de la suspension tréponémique.

Les tréponèmes servant d'antigène dans la réaction sont obtenus en provoquant une orchite spécifique expérimentale chez le lapin, aucune véritable culture *in vitro* de l'agent pathogène de la syphilis n'ayant pu être réalisée jusqu'à ce jour.

On emploie des souches de *Treponema pallidum* adaptées au lapin, et en particulier, la souche *Nichols*, qui a la propriété de provoquer des orchites en quelques jours chez cet animal.

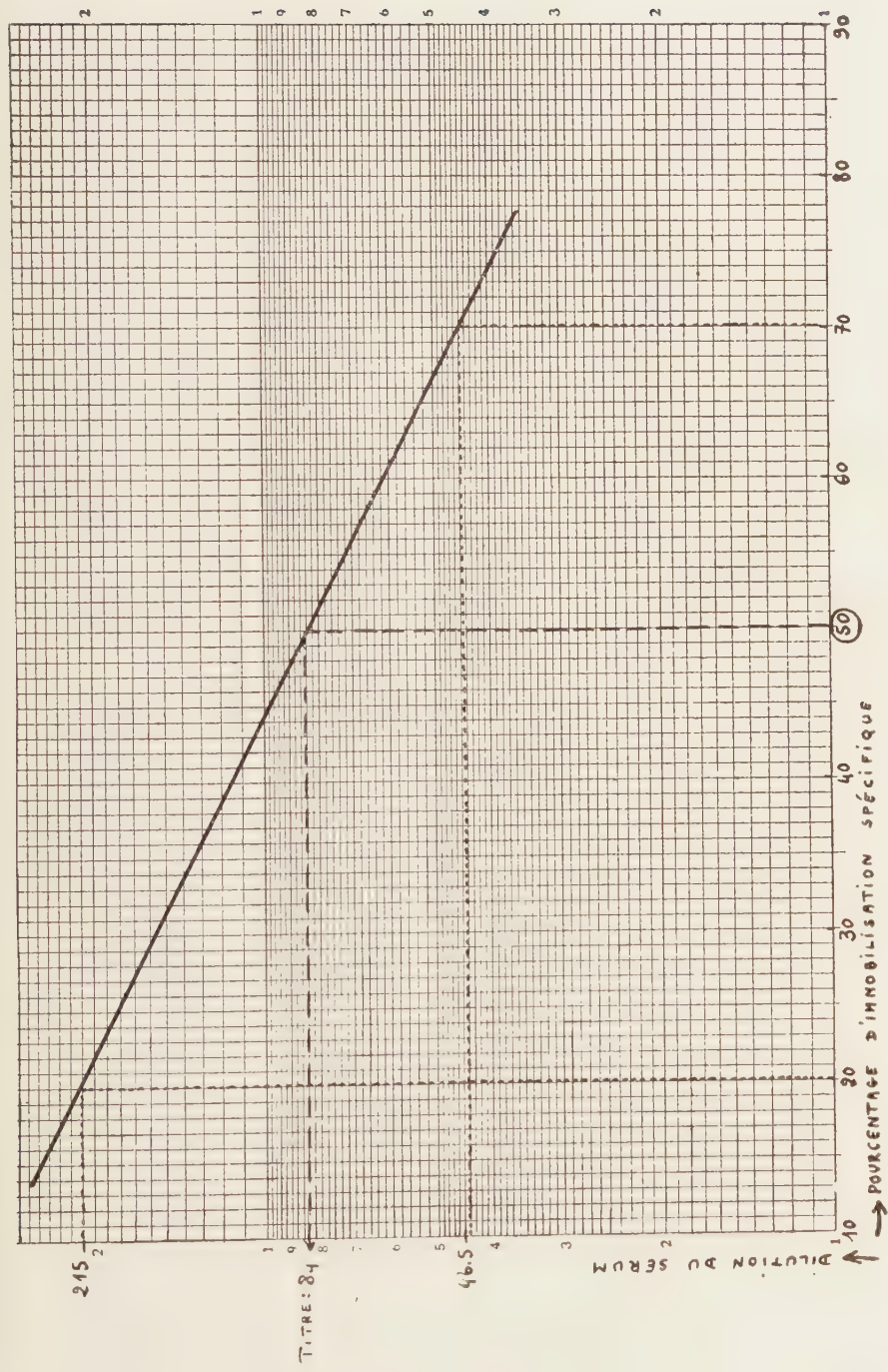
Cette souche a été isolée en 1912. Son origine a un certain intérêt, car *Nichols* et *Hough* [49] l'isolèrent d'un L.C.R. prélevé chez un sujet présentant une « neurorécidive après Salvarsan ». Ces tréponèmes ont gardé, après plus de 43 années de passage sur l'animal, toute leur virulence pour l'homme, et il convient de les manipuler avec prudence.

D'autres souches de tréponèmes peuvent être utilisées à condition qu'elles soient bien adaptées au lapin, par des passages fréquents. Nous reviendrons sur cette question plus loin.

1° INOCULATION DES LAPINS.

Les animaux qui serviront comme source de tréponèmes pour le test sont des lapins mâles, adultes, de race non sélectionnée. Ils sont infectés par voie intratesticulaire avec une suspension de tréponèmes. Cette suspension est préparée à partir d'un testicule qui a servi auparavant à l'extraction des tréponèmes en vue du test, et qui, ensuite, est finement coupé aux ciseaux puis émulsionné dans de l'eau physiologique pour obtenir une concentration du liquide surnageant de 30 à 50 tréponèmes par champ d'ultramicroscope. On injecte 1 ml de cette préparation dans chaque testicule du lapin. Il se peut que dans les 24 à 48 heures suivantes, un léger œdème des scrotum survienne, œdème qui disparaît spontanément et très rapidement ; l'orchite spécifique s'installe à partir du 6^e ou 8^e jour, rarement plus tard. Elle est décelable par la palpation des testicules qui deviennent plus fermes et augmentent de volume. Nous choisissons, pour préparer l'antigène tréponémique, des orchites apparues depuis 24 à 48 heures au maximum. Notre expérience nous a montré que le temps d'incubation de l'orchite a moins d'influence sur la sensibilité *in vivo* des tréponèmes que l'âge de l'orchite elle-même. Ainsi, des lapins infectés depuis 14 jours mais dont l'orchite n'excède pas 48 heures fourniront une suspension de tréponèmes plus satisfaisante qu'un lapin infecté depuis 8 à 9 jours, mais dont l'orchite est plus ancienne.

Nelson indique dans sa technique d'inoculer 0.5 ml par voie intra-



EXEMPLE D'UN TITRAGE

testiculaire, d'une suspension de *Treponema pallidum* préparée par émulsification dans un mélangeur de Waring de syphilômes testiculaires avec 15 ml d'une solution à 5 % d'albumine bovine cristallisée. Après légère centrifugation, cette préparation donnerait environ $5 \text{ à } 10 \times 10^7$ tréponèmes par ml.

Borel [50] a fait plusieurs reproches à cette méthode extractive de Nelson :

a) Les broyeurs courants de laboratoire ont une trop grande capacité ; si l'on utilise le broyeur de Durel et Sausse (Prolabo), à petite capacité, les couteaux tournant vite, dans un milieu épais, contenu dans une chambre de broyage étroite, peuvent provoquer une augmentation de température néfaste.

b) Le contrôle de la richesse en tréponèmes de l'inoculum est délicat ; en dépit de la centrifugation, le milieu reste visqueux et il est difficile, même à l'immersion, de compter avec rigueur les tréponèmes contenus dans un champ.

c) La consistance de l'inoculum demande, pour l'injection, de grosses aiguilles (10 ou 12/10) favorisant le traumatisme et augmentant les risques d'accidents pour les manipulateurs.

d) Le milieu, enfin (suspension de tissus broyés) peut parfois déterminer des réactions non spécifiques dans les 48 heures qui suivent l'inoculation.

Ce sont ces 4 points qui l'ont conduit à préférer un procédé plus simple et plus sûr. Il utilise comme matériel de départ les deux testicules coupés en tranches minces, qui viennent de servir pour un test, et les place dans un Erlenmeyer contenant 2,5 ml de sérum de lapin neuf ; le flacon est fixé à un agitateur rapide (type agitateur de Kahn) et agité 20 minutes à 350 oscillations par minute. Il centrifuge ensuite 7 minutes à 1 800 t/mn, prélève le liquide surnageant et en vérifie au fond noir la concentration en spirochètes. Celle-ci varie de 40 à 100 tréponèmes par champ (objectif à sec n° 5, oculaires n° 6). Tous les parasites sont vivants, ce qui n'est pas souvent le cas avec la méthode de Nelson. Parallèlement au sérum de lapin, Borel a essayé divers milieux d'extraction qui lui donnèrent les résultats suivants :

	<i>T. p/champ</i>
— Sérum physiologique	10 à 15
— Fraction V de l'albumine de bœuf	20 à 50
— Milieu de Nelson et Mayer	40 à 100
— Sérum de lapin	40 à 100
— Sérum de cheval.....	50 à 100

On peut constater que le sérum physiologique donne la plus faible richesse en tréponèmes comparée aux autres milieux extractifs. Si l'on utilise, pour l'extraction par ce procédé, le milieu dont se servent Nelson et Mayer pour assurer la survie des tréponèmes pendant les 18 heures d'étuve nécessaires pour le test, on arrive à faire sortir de très nombreux tréponèmes, mais pas plus qu'avec le sérum de lapin. Étant donné la facilité avec laquelle on peut se procurer ce sérum et son faible prix par rapport

au milieu de Nelson et Mayer, Borel lui accorde la préférence. Le sérum de cheval serait aussi un bon excipient, mais ses protéines risquent d'être toxiques pour le lapin.

On peut, avec le procédé de Borel, pratiquer 3 ou 4 extractions sur les mêmes testicules avant d'épuiser leur réserve en spirochètes, c'est-à-dire inoculer 6 à 8 lapins. Par la méthode de Nelson, il faut se contenter de deux animaux car la plus grande partie des tréponèmes reste emprisonnée dans le culot de centrifugation.

Notre expérience personnelle nous a montré que l'injection de 1 ml d'une suspension contenant 15 à 20 tréponèmes par champ microscopique est suffisante pour ne pas avoir d'échec dans la production des orchites aiguës et qu'une plus grande richesse en spirochètes ne donne pas de meilleurs résultats. Nous ne voyons pas d'avantage à substituer au sérum physiologique un autre milieu d'extraction.

D'autre part, les auteurs américains insistent sur le fait que les animaux en incubation doivent être gardés dans une pièce à air conditionné et à une température de 16 à 18 °C. En ce qui nous concerne, nos lapins sont maintenus dans une animalerie chauffée l'hiver et pourvue d'un système d'aération ; mais pendant les période de chaleur, la température de la pièce dépasse largement les 18 °C sans que nous ayons remarqué de sensibles répercussions sur le développement de l'orchite syphilitique.

2° PRÉLÈVEMENT DE L'ORCHITE, SOURCE DE TRÉPONÈMES.

Les animaux présentant une orchite ne dépassant pas 48 heures et choisis pour le test sont saignés à blanc, et les testicules sont prélevés stérilement aussitôt par voie péritonéale. Nous préférons cette méthode à celle utilisée par d'autres auteurs qui sacrifient le lapin par injection d'air intraveineuse et prélèvent l'orchite par voie scrotale. L'avantage de notre technique est que le testicule, du fait que l'animal a été saigné à blanc, est débarrassé de la plus grande partie du sang qu'il contient et que, d'autre part, le prélèvement par voie péritonéale donne plus de sécurité que la voie externe, du point de vue stérilité, pour l'acte opératoire.

Aussitôt prélevés et placés dans une boîte de Pétri stérile, les testicules sont coupés avec des ciseaux fins, en tranches de 2 à 3 mm d'épaisseur avant d'être introduits dans une fiole d'Erlenmeyer contenant le milieu de survie.

Nelson utilise pour ce sectionnement des testicules un appareil spécial muni de 10 lames de rasoir (construit par Acme Metal Products, Inc., Baltimore). L'instrument mesure $5 \times 9 \times 2$ cm et comprend deux parties séparées. La partie inférieure présente une cavité transversale profonde avec 10 rainures longitudinales étroites dans laquelle on peut placer les testicules de lapins. La partie supérieure est munie de 10 lames de rasoir disposées parallèlement à environ 5 mm les unes des autres. Quand les testicules sont disposés dans la cavité de la partie inférieure, on place la partie supérieure sur cette dernière et les lames de rasoir s'emboîtent alors dans les rainures longitudinales. Par un mouvement de haut en bas, on peut ainsi découper les testicules en 8 à 10 tranches de 5 mm environ d'épaisseur. L'appareil doit être stérilisé à sec avant son emploi.

L'utilisation de ce petit appareil ne nous a pas paru indispensable

et, pour notre part, nous lui préférons notre technique de découpage aux ciseaux fins des testicules, plus simple, beaucoup plus rapide et présentant moins de risque de contamination.

Les lamelles ainsi obtenues sont lavées dans l'eau physiologique froide avant d'être placées dans le milieu. Ce lavage n'est pas nécessaire si, comme nous le faisons, on prend la précaution de saigner le lapin avant le prélèvement. Nous mettons chaque testicule découpé dans 10 ml de milieu de base et, d'après la richesse en spirochètes constatée à l'ultramicroscope, on réajoute la quantité de milieu nécessaire pour obtenir une concentration de 5 à 10 tréponèmes par champ (objectif à sec 40 x, oculaire 12,5 x, ce qui donne un grossissement de 500 fois).

Ces procédés de préparation de la suspension tréponémique à partir de testicules de lapins présentant une orchite aiguë précoce, oblige cependant à être tributaire de ces animaux au point de vue horaire. L'évolution de l'orchite conditionne la mise en route d'une série de tests et il sembla logique de rechercher un moyen de conserver, ou plutôt de stabiliser la source de tréponèmes dans l'état idéal désiré pour le test. On sait que les tréponèmes sont capables de recouvrer toute leur vitalité après conservation plus ou moins prolongée à -60°C . Des essais furent donc entrepris dans plusieurs laboratoires pour tenter de conserver au froid les testicules en orchite, afin de les reprendre au moment opportun. Chorpenning, Sanders et Kent [51], en appliquant rigoureusement la technique suivante, obtiennent des résultats fort encourageants : ils prélèvent les testicules dès que l'orchite est cliniquement manifeste, les découpent et les lavent rapidement à l'eau physiologique très froide. Puis, les testicules sont placés dans un tube stérile bouché au coton cardé et congelés le plus rapidement possible dans un mélange neige carbonique-alcool absolu (-78°C). Le tube est recouvert d'une capsule de caoutchouc et paraffiné. Il est alors déposé immédiatement dans une caisse à neige carbonique dont la température doit demeurer entre -55 à -65°C . Après une à douze semaines de conservation, pour utiliser ces testicules comme sources de tréponèmes pour un test, on plonge le tube rapidement dans l'eau à $+35^{\circ}\text{C}$ en agitant. Les testicules décongelés sont immédiatement placés dans le milieu de base selon le procédé habituel. En suivant cette technique, Chorpenning a exécuté d'avril 1951 à juin 1952, 42 tests. Dans deux essais seulement la survie ne fut pas satisfaisante. La mobilité des tréponèmes après les 18 heures d'incubation fut, en moyenne, de 87 %, soit légèrement inférieure à celle obtenue avec des testicules fraîchement récoltés. L'auteur observa même quelquefois une mobilité un peu plus élevée à la 18^e qu'à l'heure 0 et constata que les mouvements des tréponèmes frais ou conservés étaient identiques. Des sérums furent testés quantitativement et comparativement avec des suspensions de tréponèmes provenant de testicules frais et congelés d'un même lapin : les titres obtenus (ex. : 233 unités et 225 unités respectivement) pour un sérum, furent en général très voisins. Après l'extraction des tréponèmes pour le test, ces mêmes testicules peuvent servir pour l'inoculation de lapins neufs de la même manière que des testicules frais. L'orchite apparaît un peu plus tardivement (14 jours en moyenne au lieu de 8 jours) et cependant, on n'observe pas de sensibilisation *in vivo* des tréponèmes comme on pourrait s'y attendre.

Ce procédé de conservation au froid de la source tréponémique peut être intéressant pour des laboratoires qui débitent peu de tests de Nelson et désirent grouper les examens à faire, en inoculant un minimum de lapins.

B. Préparation du milieu de survie.

1^o MILIEU NORMAL.

Les proportions de chaque constituant du milieu ont été mentionnées dans les données générales de la technique. Le mélange de ces diverses solutions ne se faisant qu'extemporanément, chacune doit donc être préparée, stérilisée et conservée dans des conditions bien définies qui sont les suivantes :

- *Albumine bovine totale cristallisée.*
(préparée par les laboratoires Armour, Chicago - U.S.A.). Solution à 5 % dans l'eau physiologique ajustée à pH 7 avec de la soude normale. Stérilisation par filtration sur filtre Seitz (membrane S), sous pression. Conservation à — 20 °C.
- *Tampon phosphaté.*
Solution de phosphate disodique ($\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}, 12 \text{ OH}_2$) N/10 — 40 ml. Solution de phosphate monopotassique (PO_4KH_2) N/15 — 10 ml. Vérifier le pH qui doit être de 7 à 7,1. Stérilisation par filtration sous pression. Conservation à + 4 °C.
- *Thioglycolate de sodium.*
Solution d'acide thioglycolique (Prolabo) à 1,50 g % dans l'eau distillée. On ajoute de la lessive de soude jusqu'à obtention du virage au rouge de la phenolphthaleine.
Stérilisation par filtration sur filtre Seitz, par aspiration (l'air comprimé utilisé par la filtration sous pression détruisant d'une manière notable le pouvoir réducteur de ce corps).
Conservation à — 20 °C pendant une semaine au maximum.
- *Cystéine.*
Solution de chlorhydrate de l-(+) cystéine (Hoffmann-La Roche) à 0,63 g % dans l'eau physiologique. Stérilisation sur filtre Seitz sous pression et conservation à — 20 °C en fractionnant les quantités pour éviter les congélations et décongélations successives, chaque fois que l'on prépare du milieu, celles-ci entraînant la réprécipitation de la cystéine en solution.
- *Glutathion.*
Solution de glutathion (Hoffmann-La Roche) à 1,23 g % dans l'eau physiologique. Stérilisation sur filtre Seitz sous pression. Conservation à — 20 °C.
- *Pyruvate de sodium.*
Deux procédés de préparation, ce sel étant instable et de conservation difficile. Nous donnons notre préférence à la première.
a) Préparer une solution de 0,69 ml % d'acide pyruvique dans l'eau physiologique. Ajuster à pH 7 avec de la soude normale. Stériliser par filtration sur filtre Seitz sous pression et conserver à — 20 °C au maximum 2 semaines.

b) Préparer le sel cristallisé de la manière suivante [48-56] :

Solution A :

NaOH à 43 %	1 ml
Alcool.....	10 ml

Solution B :

Acide pyruvique	3 ml
Alcool	30 ml

Ajouter très doucement, à la burette, la solution A à la solution B jusqu'à neutralité. Filtrer par aspiration sur une plaque de verre fritté la solution neutralisée. Laver le filtre à l'alcool, puis à l'éther. Reprendre les cristaux et les dissoudre dans l'alcool à 80°, au bain-marie à 56 °C.

Refiltrer à chaud sur verre fritté.

Laisser cristalliser au froid et évaporer sous vide.

Conserver les cristaux de pyruvate de sodium ainsi obtenu dans un dessiccateur sous vide et au froid.

On prépare alors une solution de pyruvate de sodium à 1 % dans l'eau physiologique. Après stérilisation par filtration sous pression, on conserve à — 20 °C au maximum deux semaines.

— *Bicarbonate de sodium.*

Solution à 1,26 g % dans l'eau bidistillée.

Stérilisation par filtration sur filtre Seitz sous pression et conservation à + 4 °C limitée à deux semaines au maximum.

Chaque solution stock doit être contrôlée, du point de vue stérilité, par une culture sur bouillon ordinaire, après sa préparation.

A ce procédé de préparation du milieu de survie, deux variantes ont été proposées, l'une par Fribourg-Blanc [52] d'une part, et Ajello, Portnoy, Logan et Olansky [53] d'autre part, et l'autre par L. Meinicke [54].

Le premier de ces auteurs, au lieu de préparer des solutions stocks de chaque constituant, pèse les poudres, les dissout selon la technique indiquée, puis fait passer l'ensemble du milieu sur un filtre démontable, stérilisable, de sa fabrication (Prolabo). Ainsi préparé et conservé à — 20 °C le milieu lui donnerait toujours une survie parfaite et se conserverait 2 ou 3 mois. Ajello et coll. pratiquent de même et sont pleinement satisfaits de leur procédé.

L. Meinicke, d'autre part, a commercialisé un milieu de survie pour la réaction de Nelson, dans lequel les constituants entrent dans les proportions suivantes, pour un volume total de 50 ml de milieu.

Albumine de bœuf cristallisée.....	1 000 mg
Phosphate disodique	180 mg
Phosphate monopotassique.....	25 mg
Pyruvate de sodium	5 mg
Thioglycolate de sodium.....	75 mg
Glutathion.....	15 mg
Chlorhydrate de cystéine.....	10 mg
Bicarbonate de sodium	30 mg

Ce mélange de poudre est délivré en flacon brun bouchant émeri. Il suffit d'ajouter 2,5 ml d'ultrafiltrat de sérum de bœuf et de compléter à 50 ml avec de l'eau physiologique pour obtenir un milieu de survie qui sera stérilisé par passage sur filtre bactériologique.

2^o ÉTUDE PORTANT SUR LES DIVERS COMPOSANTS DU MILIEU.

Cette étude s'attache à la recherche du rôle de chacun des éléments et de leur optima d'action.

a) Albumine.

Nous avons vu que, pour le milieu, on utilisait l'albumine bovine totale cristallisée en solution à 5 %. Le coût assez élevé de cette albumine a conduit à essayer de la remplacer par la fraction V (de Cohn) de plasma bovin qui est beaucoup moins onéreuse. Nelson et Diesendruck [55] en avaient signalé la possibilité dans une de leurs études portant sur les facteurs influençant l'immobilisation. Cette substitution est réalisable mais, dans la majorité des cas, la survie des tréponèmes est moins bonne dans ces dernières conditions.

Tout récemment, le Centre national de transfusion sanguine nous a confié un échantillon d'albumine humaine (fraction V) cristallisée, en vue de remplacer l'albumine bovine totale difficile à se procurer. Les résultats « provisoires » que nous avons obtenus nous font placer cette albumine entre la fraction V et l'albumine totale bovine quant à la qualité du milieu de base ainsi obtenu.

Par ailleurs, un certain nombre d'études ont été faites avec des sérums de différentes espèces animales, ces sérums devant servir de base protéinique au milieu de survie des tréponèmes, à la place de l'albumine bovine. Nous reviendrons plus loin sur ces milieux de remplacement.

b) Thioglycolate de sodium.

Dans la technique originale, la concentration finale du milieu en thioglycolate était de 0,016 %. Son rôle étant principalement celui d'un réducteur, et cette propriété étant essentielle pour la conservation de la mobilité des tréponèmes, pour une plus grande sécurité, on a doublé [55] et même quadruplé [57] la proportion initiale du thioglycolate.

A l'avantage d'un pouvoir réducteur augmenté et d'une survie améliorée, s'oppose le fait que le milieu a acquis, dans ces conditions, un pouvoir anticomplémentaire légèrement accru. On y remédia en augmentant la quantité de complément dans les réactions.

c) Autres éléments.

Complexe vitaminique. — Aucunes modifications, ni dans les proportions, ni dans le remplacement des autres éléments ne se sont montrées, jusqu'à ce jour, favorables pour améliorer la survie ou simplifier la préparation du milieu tel que nous l'avons décrit. Toutefois, nous devons signaler deux simplifications au premier milieu de base décrit par les promoteurs de la réaction. La première a été proposée par Nelson et Mayer eux-mêmes et consiste en la suppression du *complexe vitaminique* qu'ils ajoutaient dans leurs premiers essais concernant la mise au point du T.P.I. La formule en était la suivante :

	<i>pour 100 ml de milieu</i>	
Chlorhydrate de thiamine.....	100	microgrammes
Niacine.....	100	—
d-pantothenate de calcium.....	50	—
Pyridoxine.....	50	—
Riboflavine.....	50	—
Chlorhydrate de choline.....	50	—
Inositol	50	—
Biotine	1	—
Acide folique	1	—

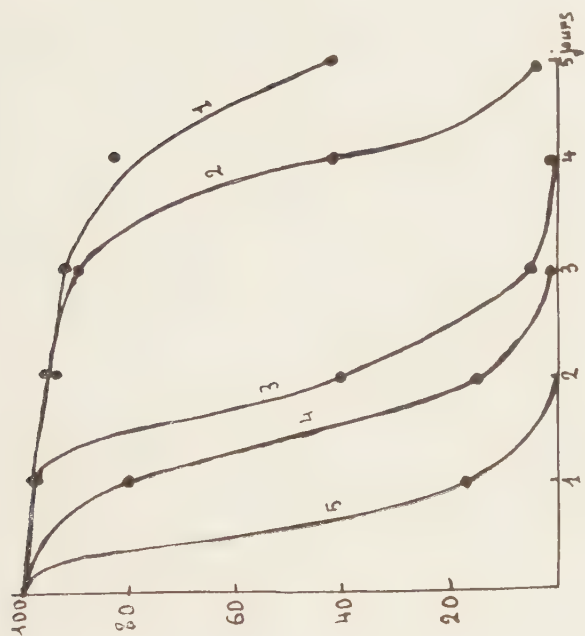
Préparer une solution-mère 100 fois plus concentrée de l'ensemble de ces facteurs de croissance. Stériliser par filtration sur filtre Seitz sous pression et conserver à -20°C . On ajoute 1 ml de cette solution stock pour 100 ml de milieu préparé.

Il apparut rapidement que l'addition de ce complexe vitaminique au milieu de base n'était pas indispensable à la survie des tréponèmes. Utilisé surtout par Nelson, au début de ses essais, il est complètement abandonné aujourd'hui par tous ceux qui travaillent au test d'immobilisation des tréponèmes.

Ultrafiltrat de sérum de bœuf. — La seconde simplification consiste en la suppression de l'ultrafiltrat de sérum de bœuf.

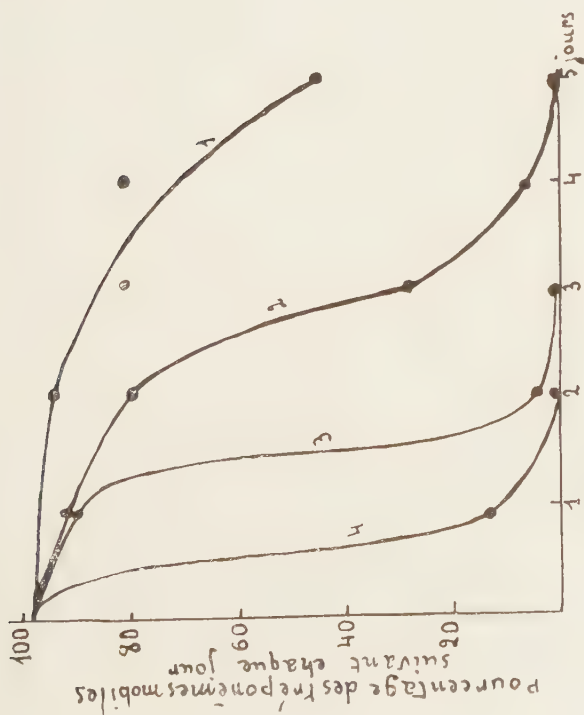
Le milieu normal de survie de Nelson, tel que nous l'avons décrit, peut presque être considéré comme synthétique, puisque tous les éléments qui le constituent sont chimiquement connus et qu'il est, de ce fait, parfaitement reproductible. Toutefois, Rice et Nelson [58] ont montré que ce milieu, à lui seul, ne permettait pas la survie des tréponèmes plus de 12 à 24 heures, mais que la présence d'extraits de tissu testiculaire, ou bien l'addition d'un ultrafiltrat de sérum normal de lapin, d'homme ou de bœuf, permettait d'obtenir une meilleure survie des spirochètes pendant 5 à 8 jours.

L'essai suivant [59] met bien le fait en évidence : un testicule de lapin syphilité, découpé en minces rondelles, est placé dans 10 ml de milieu de base de Nelson. Après 2 heures d'agitation dans les conditions habituelles de température et d'anaérobiose, la suspension est centrifugée 5 minutes à 2 000 t/mn pour éliminer les hématies, les spermatozoïdes et les débris tissulaires. Le liquide surnageant contenant les tréponèmes est décanté et constitue l'émulsion A. Une partie de cette émulsion est recentrifugée à 8 000 t/mn pendant 50 minutes à 5°C (pour éviter le réchauffement par la longue centrifugation). Le liquide surnageant est éliminé et le sédiment de tréponèmes est remis en suspension dans un égal volume de milieu de base nouveau. Cette émulsion B ne contient donc pratiquement plus d'extrait testiculaire. On met 0,8 ml de chaque émulsion A et B dans deux tubes respectivement, avec 0,2 ml d'eau physiologique (volume remplaçant celui du sérum + complément, dans les réactions habituelles) et on prépare un troisième tube avec 0,8 ml d'émulsion B et 0,2 ml d'un ultrafiltrat de sérum de bœuf. Tous les tubes sont gardés en anaérobiose à 35°C et examinés à l'ultramicroscope, à intervalles de 24 heures. On détermine chaque fois le pourcentage de mobilité, et on constate, avec l'émulsion B, qu'il tombe à 0 % après 48 h, alors qu'avec l'émulsion A, il est encore de 44 % au



Courbe	1	2	3	4	5
Vol. pour cent	20,0	4,0	0,8	0,16	0

Essai avec ultrafiltrat
de sérum de Bœuf



courbe	1	2	3	4
$\chi_{\text{par ml}}$	15,0	45,0	3,0	0,6

Essai avec $C_{12}H_{22}O_{10}$, H_2O

5^e jour et de 38 % après ce même laps de temps dans le tube contenant l'ultrafiltrat de sérum de bœuf avec l'émulsion B. Il ressort de cet essai que l'ultrafiltrat du sérum de bœuf supplée parfaitement bien à l'absence d'extrait testiculaire. Nelson et Rice concluent à la présence dans ces ultrafiltrats de sérum, d'éléments nutritifs supplémentaires augmentant la survie des spirochètes et ils réussirent à définir et isoler chimiquement un corps ternaire qui fut appelé par eux « treponemal survival factor ». Ce corps aurait la formule globale suivante : $C_{12}H_{22}O_{10}, OH_2$. Il est soluble dans l'alcool, l'acétone, le chloroforme, le benzène, insoluble dans l'éther de pétrole et peu soluble dans l'eau. Les courbes ci-contre montrent les pourcentages de tréponèmes mobiles *in vitro* après 5 jours d'étuve dans le milieu de base contenant soit de l'ultrafiltrat de sérum de bœuf à diverses solutions, soit le composé sérique $C_{12}H_{22}O_{10}, OH_2$, à différentes concentrations, le milieu de base étant dépourvu de sérum ou d'extrait tissulaire. On peut constater que le pourcentage de survie est pratiquement le même dans les deux essais, pour les mêmes intervalles de temps.

L'ultrafiltrat de sérum de bœuf peut être préparé par filtration sur cellophane du sérum de bœuf pur ; ou bien il peut être obtenu dans divers laboratoires tels que, aux U.S.A. le « Microbiological Laboratories, Coral Gables, Floride », et en France, le laboratoire Renard, à Paris.

La plupart des laboratoires qui effectuent le test de Nelson ajoutent systématiquement de l'ultrafiltrat à leur milieu de survie.

Pour notre part, un tel procédé n'a jamais augmenté le pourcentage de survie des tréponèmes comparativement au milieu tel que nous l'utilisons. Peut-être est-ce le fait de ne pas laver les fragments de testicules à l'eau physiologique avant de les introduire dans le milieu qui rend celui-ci plus riche en extrait testiculaire ? d'où l'inutilité de l'ultrafiltrat ?

Nous voyons ainsi le double avantage que nous avons à saigner les lapins à blanc avant de prélever les testicules. L'absence de sang rend inutile le lavage des rondelles de testicules à l'eau physiologique glacée et la suppression de ce lavage permet d'avoir un milieu de base plus riche en sue testiculaire, rendant inutile l'addition d'ultrafiltrat de sérum.

3^o ÉTUDE DE DIVERS MILIEUX DE REMPLACEMENT.

Un certain nombre d'auteurs ont cherché, vu la complexité du milieu de Nelson, et de sa courte conservation, des produits de remplacement capables de maintenir les tréponèmes en survie pendant la durée de la réaction.

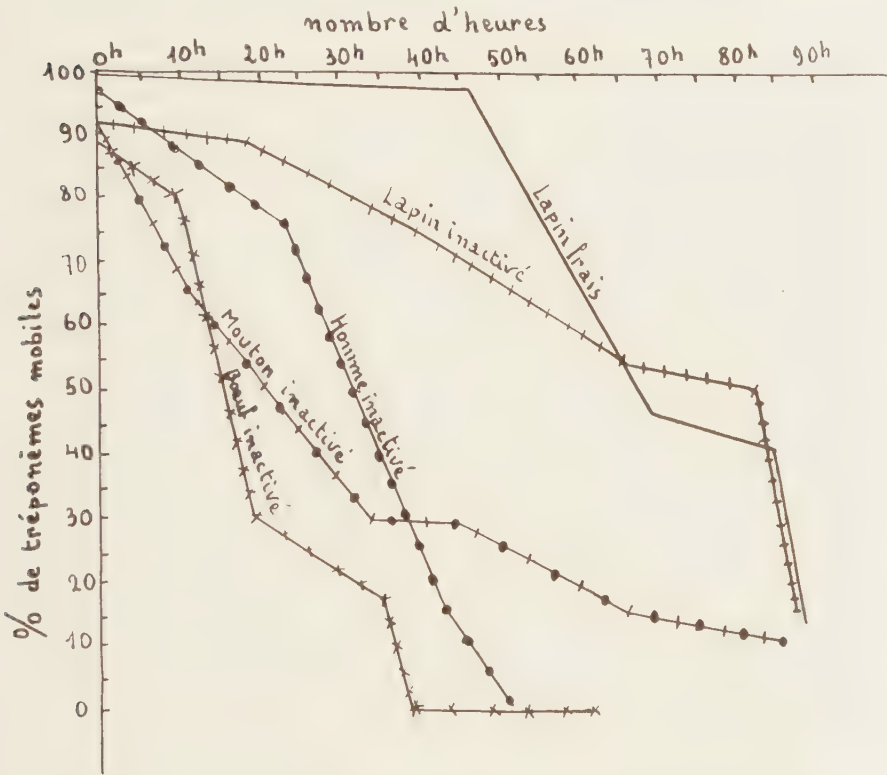
a) Milieux sériques.

Ranque, Moignoux et Depieds [60] ont étudié un certain nombre de milieux sériques. Leurs essais ont consisté à observer la survie des tréponèmes dans les sérums de lapin, de mouton, de bœuf et humain. L'extraction des spirochètes est faite dans ces sérums et la première suspension tréponémique obtenue est diluée avec le même sérum pur de façon à obtenir 8 à 15 spirochètes par champ d'ultramicroscope. Après avoir déposé les tubes en anaérobiose à 35 °C, on effectue une première détermination du pourcentage de mobilité à la 12^e heure, puis toutes les 6 heures jusqu'à la 90^e heure.

Les résultats obtenus, portés sur le graphique ci-contre, montrent

qu'avec le sérum de lapin frais la survie demeure excellente (98 %) jusqu'à la 48^e heure, puis diminue progressivement jusqu'à 42 % à la 66^e heure, 36 % à la 82^e heure pour s'annuler à la 90^e heure.

Le sérum de lapin inactivé permet d'obtenir de moins bonnes survies initiales (94 %), mais une bonne conservation : 90 % à la 18^e heure, 85 % à la 24^e heure, 82 % à la 30^e heure, 74 % à la 42^e heure, 54 % à la 66^e heure, taux qui se maintient tel jusqu'à la 84^e heure, puis s'annule à la 90^e heure.



Avec le sérum humain inactivé, bonne survie initiale (97 %), mais chute plus rapide (82 % à la 18^e heure) et plus accusée à partir de la 24^e heure, amenant une immobilisation complète à la 50^e heure.

Le sérum de mouton ne donne pas de bonnes survies dans les 30 premières heures, mais paraît conserver la mobilité des tréponèmes résiduels aussi longtemps que le sérum de lapin. Le sérum de bœuf constitue le plus mauvais des milieux essayés (40 % de mobilité seulement à la 18^e heure).

Il paraît intéressant de noter que le sérum de l'animal le plus sensible à la souche Nichols, le lapin, conserve le mieux la mobilité des tréponèmes, tandis que le bœuf, qui est réfractaire, fournit un sérum peu favorable au maintien de la survie des spirochètes.

A cette remarque des auteurs, on peut répondre que si le tréponème

se conserve mieux dans le sérum de lapin que dans les autres sérums, c'est probablement parce que cet animal est particulièrement réceptif à la syphilis, et parce que la souche Nichols est conservée, depuis son isolement, sur le lapin.

R.A. Boak et J.N. Miller [61], d'autre part, intéressés par ce même problème, préparent un milieu de survie qui n'est autre que du sérum de lapin normal, inactivé pendant 45 minutes à 70 °C juste avant de l'utiliser et équilibré ensuite pendant quelques heures avec le mélange gazeux (95 % N + 5 % CO₂). Ils exécutent des réactions d'immobilisation avec une suspension de tréponèmes dans ce milieu sérique, selon la méthode classique avec 22,2 % de complément de cobaye et arrivent aux conclusions suivantes : des tests faits comparativement avec le milieu de base normal et le milieu « sérum de lapin » ont donné non seulement des résultats identiques en sensibilité d'après les tests quantitatifs, mais de plus, une meilleure conservation des tréponèmes dans le dernier milieu. Des essais simultanés faits avec le sérum de lapin pur ou le même sérum dilué au demi dans de l'eau physiologique de pH 7, se sont montrés parallèles en tous points. Les résultats obtenus par Boak et Miller confirment donc et complètent même ceux de Ranque, quant à la valeur du sérum de lapin en tant que milieu de survie pour l'extraction des tréponèmes du testicule syphilité et pour l'exécution de la réaction d'immobilisation elle-même.

Cependant, nos propres essais furent moins satisfaisants. Nous avons, en effet, comparé, d'une part, la survie des tréponèmes, d'autre part, la sensibilité du test, dans deux milieux à base de sérum de lapin inactivé, l'un : sérum de lapin dilué au demi uniquement dans du Tyrode, l'autre : même sérum dilué au demi, additionné de 5 % d'une solution à 1,50 g % de thioglycolate de sodium. Après 24 heures de conservation dans les conditions habituelles du test, et comparativement au milieu normal de base de Nelson, si la sensibilité du test est pratiquement identique, le pourcentage moyen de survie observé avec les milieux au sérum de lapin est nettement inférieur à celui obtenu avec le milieu normal.

Il se chiffre ainsi :

	% de tréponèmes mobiles	
	après 24 h	après 48 h
— Milieu normal de survie de Nelson.....	96 %	90 %
— Milieu sérum de lapin dilué au 1/2 + thio- glycolate	88 %	48 %
— Milieu sérum de lapin dilué au 1/2 sans thioglycolate	80 %	28 %

Il faut noter également que le sérum de lapin, même normal, possède un pouvoir anticomplémentaire très accusé par rapport au sérum humain par exemple et au milieu de survie de Nelson. L'emploi d'une large dose de complément (20 %) dans la réaction supplée à cet inconvénient, et comme on peut le constater, l'excès de complément est encore décelable à la fin de la réaction.

b) Milieu à base d'extrait d'embryon de souris.

Un milieu de remplacement très différent de ceux précédemment cités a été proposé à J. Delacrétaz [62], de Lausanne. Il consiste en 5 % d'un extrait embryonnaire de souris et 10 % de sérum humain ou ovin dans une solution physiologique tamponnée (Tyrode). Ce milieu, que l'auteur désigne par les initiales E.E.S. (Extrait-Embryonnaire-Sérum) peut être préparé de la manière suivante :

1° Préparation de la solution physiologique tamponnée de Tyrode :

NaCl	4,0	g
KCl	0,1	
CaCl ₂	0,1	
MgCl ₂	0,05	
NaH ₂ PO ₄	0,025	
NaHCO ₃	0,3	
Glucose	0,5	
H ₂ O	q.s.p.	500 ml

Laisser reposer cette solution pendant 24 heures, puis ajuster le pH à 7. Filtrer sur bougie Chamberland 5L3, et mettre en ampoules de 20 ml.

2° Préparation de l'extrait d'embryons de souris.

Sacrifier une souris bien portante dans les 2 ou 3 jours qui précèdent la mise bas, c'est-à-dire vers le 18^e ou 19^e jour de la gestation. Extraire stérilement de l'utérus les embryons, et les hacher aux ciseaux. Les immerger ensuite dans du Tyrode à raison de 1 ml par embryon. Après 5 minutes d'agitation à l'appareil de Kahn, centrifuger 10 minutes à 2 500 t/mn et décanter. Cet extrait peut être conservé à + 5 °C pendant une à deux semaines.

3° Choix du sérum.

On choisira un sérum qui ne présente aucune action immobilisante, spécifique ou non, sur les tréponèmes pâles et qui n'est ni trouble ni opalescent.

4° Préparation du milieu.

Ajouter, dans les heures précédant l'exécution du T.P.I., l'extrait embryonnaire (5 %), le sérum humain ou ovin (10 %) et le Tyrode (85 %). Le mélange se fait dans une fiole à extraction que l'on purgera ensuite de l'air qu'elle contient pour y introduire un mélange gazeux formé de 95 % d'azote et 5 % d'anhydride carbonique. Le milieu est alors prêt à l'emploi.

5° Résultats.

J. Delacrétaz a observé une survie des tréponèmes dans ce milieu E.E.S. en anaérobiose et à 35 °C, se chiffrant à 70 % au minimum, après 60 à 72 heures, selon les essais. Utilisé pour le T.P.I. lui-même, ce milieu a donné, en réaction qualitative, les mêmes résultats que le milieu de Nelson pour tous les sérums positifs ou négatifs. De plus, l'auteur a pratiqué pour quelques sérums des réactions quantitatives parallèlement en

milieu Nelson et en milieu E.E.S. Il trouva des taux d'immobilisation plus forts avec son propre milieu, et pense que cette augmentation de sensibilité serait due à la plus grande rapidité de la réaction avec le E.E.S. (après 18 heures d'incubation).

D'autre part l'auteur signale la possibilité de conserver ce milieu pendant plusieurs mois sous forme lyophilisée.

En résumé, les résultats les plus satisfaisants obtenus en remplacement du milieu de base de Nelson ont été fournis par le sérum de lapin employé non dilué et dans nos essais par ce même sérum mais additionné de Tyrode et de thioglycolate.

Delacrétaz donne la préférence à l'extrait d'embryon de souris dilué dans le Tyrode et le sérum humain ou ovin.

Nous devons ajouter que nous avons obtenu des résultats favorables également en diluant simplement le milieu de survie normal de Nelson dans un volume égal de Tyrode. Ce dernier procédé, s'il ne présente pas d'avantage au point de vue préparation, possède celui de diminuer le prix de revient du milieu qui, du fait de la quantité d'albumine totale bovine cristallisée qu'il contient, est assez onéreux.

C. Prélèvement et conservation des sérums et autres liquides à examiner.

1° SÉRUMS.

Le prélèvement du sang des malades, en vue d'un test d'immobilisation des tréponèmes, doit être pratiqué dans certaines conditions qu'il est important de préciser :

Le sang doit être prélevé par ponction veineuse avec une seringue stérilisée à sec et n'ayant pas servi, auparavant, à des injections médicamenteuses, car des traces de certains produits pourraient être toxiques pour le tréponème et entraîner une réaction non satisfaisante.

Il en sera de même si le prélèvement est fait alors que le malade est en cours de traitement par un antibiotique tréponémicide par exemple, le sérum, dans ce cas, pouvant empêcher la réaction. Toutefois, pour la pénicilline, l'addition de pénicillinase au sérum annule le pouvoir toxique de cet antibiotique.

Il est également recommandé de faire ce prélèvement le malade étant à jeun, pour éviter l'opalescence des sérums, celle-ci gênant énormément la lecture à l'ultramicroscope, la rendant quelquefois impossible.

Le sang est ensuite recueilli dans un tube stérile et de préférence directement dans un tube à centrifuger pour éviter une manipulation supplémentaire pouvant entraîner des risques de contamination. Après coagulation, le tube est centrifugé et le sérum, décanté stérilement, sera inactivé avant la réaction pendant 30 minutes à 56 °C. Les sérums peuvent être conservés en vue du test soit à + 4 °C, soit, ce qui est mieux, à - 20 °C. La conservation à basse température est conseillée dans la méthode originale, toutefois, les nombreuses expériences réalisées depuis,

ont montré que l'anticorps immobilisant se conserve très bien à $+ 4^{\circ}\text{C}$ pendant plusieurs mois. Nos propres essais le confirment.

L'Organisation mondiale de la Santé avait demandé à un certain nombre de laboratoires — dont le nôtre — d'étudier la reproductibilité du test sur un mélange de sérum de lapins syphilités expérimentalement. Ce mélange fut préparé par l'institut de Sérothérapie de Copenhague et envoyé sans précautions spéciales aux laboratoires qui se chargèrent de cette étude. Ce sérum, conservé à $+ 4^{\circ}\text{C}$, fut titré à plusieurs reprises et son taux d'anticorps a été retrouvé sensiblement inchangé pendant 14 mois. Ceci prouve que, malgré un voyage d'environ 48 heures à température ambiante, et une conservation de plus d'un an à $+ 4^{\circ}\text{C}$, les immobilisines restent intactes.

2° LIQUIDE CÉPHALO-RACHIDIEN.

Le liquide céphalo-rachidien sera prélevé dans les mêmes conditions que pour tous autres examens biologiques ; la seule condition à observer strictement est sa parfaite stérilité. Comme pour les autres réactions sérologiques, le test d'immobilisation sera exécuté avec un volume plus grand de liquide (0,1 ml) par rapport à celui du sérum (0,05 ml).

3° AUTRES LIQUIDES BIOLOGIQUES.

Le T.P.I. est réalisable sur des liquides de ponction, tel le liquide arthropatique, etc.

D. Le complément.

La meilleure source de complément est le sérum frais de cobaye. Il sera désigné par l'abréviation C' couramment employée.

1° PRÉPARATION.

Ce sérum, comme tous les composants entrant dans la réaction, doit être employé à l'état stérile. On récolte le sang de plusieurs cobayes mâles adultes, à jeun depuis 12 heures, soit par ponction cardiaque, soit, pour obtenir des quantités plus grandes, en saignant à blanc les animaux par section de la carotide.

Après coagulation, le sérum est séparé du caillot par centrifugation légère et, si le sang n'est pas recueilli stérilement, le sérum sera passé sur un filtre Seitz de porosité S.

Le sérum peut être conservé ou bien *par lyophilisation*, ou bien *par le froid*, soit à $- 20^{\circ}\text{C}$ pendant 15 jours environ, soit à $- 75^{\circ}\text{C}$ dans la neige carbonique pendant 4 à 6 semaines. Il y a intérêt à le conserver par petits lots de 10 ml en tubes à essai pour éviter des congélations et décongélations successives, à chaque fois que l'on a besoin de complément, ces manipulations nuisant à son activité.

2° TITRAGES.

Le mélange du sérum d'un grand nombre d'animaux fournit pratiquement un complément d'activité suffisante et nous n'avons jamais eu

de lot de complément, préparé dans de telles conditions, qui ne nous ait donné satisfaction. Toutefois, il est préférable de s'assurer, par un titrage préalable, de son activité. Ce titrage peut être effectué soit par la méthode décrite par Ledbetter et Martens, soit plus simplement, par la technique utilisée dans le B.W. Kolmer simplifié qui est celle que nous pratiquons.

a) Titration d'après Ledbetter et Martens [63].

Mettre 5 ml de sang de mouton conservé sur solution d'Alsever* dans un tube à centrifuger. Soumettre à une centrifugation de 2 000 t/min pendant 5 minutes. Décanter le liquide surnageant et laver le culot d'hématies avec 10 ml de tampon véronal isotonique** trois fois de suite. Après la dernière centrifugation, faire une suspension à 5 % environ des hématies dans le tampon véronal. Prélever 1 ml de cette suspension dans un flacon et ajuster à 15 ml avec une solution à 0,01 % de carbonate de soude. Agiter et lire la densité optique (D.O.) au photomètre avec une longueur d'onde de 541μ. La D.O. doit être de 0,700 μ environ. Diluer la suspension originale d'hématies de façon à avoir une densité optique de 0,680 μ de la manière suivante :

$$\frac{0.700 \text{ (D.O. observée)}}{0.680 \text{ (D.O. désirée)}} = 1.029$$

A 10 ml de la suspension d'hématies initiale, ajouter : $(10 \times 1.029 = 10.290)$ 0,290 ml de tampon véronal.

Prélever 1 ml de cette nouvelle suspension et faire lyser comme le premier essai avec la solution de carbonate de soude. Lire au photomètre la D.O. obtenue. Celle-ci doit se situer entre 0,675 et 0,685.

Cette suspension d'hématies est sensibilisée avec un volume égal d'hémolysine au 1/1000 et le titrage du complément est effectué selon le mode indiqué dans le tableau I :

() Solution d'Alsever :*

à 100 ml d'eau distillée ajouter :

2,05 g de glucose
0,8 g de citrate de soude
0,42 g de chlorure de sodium

ajuster à pH 6,1 avec de l'acide citrique.

Pour conserver les hématies, mélanger à volume égal le sang et la solution ainsi obtenue.

*(**) Solution de tampon véronal isotonique :*

NaCl	8,38	g
CO ₃ HNA.....	0,252	g
Sodium, 5,5, diethyl barbiturate ..	0,3	g
Acide, 5,5 diethyl barbiturique ..	0,46	g
Cl ₂ Mg. 6 H ₂ O	0,1	g
Cl ₂ Ca. 2 H ₂ O	0,02	g
Eau distillée	q.s.p.	1 000 ml

le pH doit être environ de 7,3 à 7,4

TABLEAU I

TUBE N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Hématies sensibilisées ..	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Tamp. vérolal	5,5 ml	6,5 ml	5,5 ml	5,5 ml	5,5 ml	5,5 ml	5,5 ml	5,5 ml	5,5 ml	5,5 ml
1 ml de C' aux dilutions suivantes	1/20	—	1/180	1/180	1/200	1/200	1/220	1/220	1/240	1/240
D.O.	0.688	0.012	0.344	0.347	0.320	0.317	0.298	0.295	0.264	0.254
D.O. corrigée. (*)	0.676	—	0.322	0.335	0.308	0.305	0.286	0.283	0.252	0.242
% d'hémolyse (**)	100	—	49.1	49.5	45.5	45.1	42.3	41.8	37.4	36.6
(*) D.O. corrigée = $\frac{D.O. - 0.012}{D.O. corrigée}$										
(**) % d'hémolyse = $\frac{0.676}{0.676}$										

Le titre du complément est donné par l'inverse de la dilution du premier tube qui donne 50 % d'hémolyse. Le complément doit titrer environ 180 à 230 unités par millilitre pour être satisfaisant.

b) Titrage selon la technique de Kolmer simplifiée.

Préparer une solution isotonique à 8,5 g de chlorure de sodium et 0,1 g de sulfate de magnésium par litre d'eau distillée. Cette solution saline sera utilisée à la place du sérum physiologique pour toutes les manipulations.

Laver des globules de mouton conservés en milieu citraté et formolé avec la solution saline de Kolmer. Après le troisième lavage, préparer une suspension d'hématies à 2 % du culot de centrifugation dans la solution isotonique. Diluer, d'autre part, une hémolysine titrée à 10 000 unités hémolytiques par ml par exemple, au 1/400 et faire le titrage du complément dilué au préalable au 1/20 d'après la technique décrite dans le tableau II ci-après :

TABLEAU II

TUBE N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10 témoin GR
Complément dilué au 1/20.....	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30	0.35	0.40	0.45	0.50	—
Solution saline isotonique	1.90	1.85	1.80	1.75	1.70	1.65	1.60	1.55	1.50	2
Mettre 30 minutes au B.-M. à 37 °C.										
GR à 2 %	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Hémolysine diluée..	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Remettre au B.-M. à 37 °C pendant 30 minutes.										

La lecture du titrage se fait après ce deuxième temps au B.-M. à 37 °C. Le tube 10 ne doit présenter aucune hémolyse puisqu'il ne contient pas l'alexine. Par contre, pour être satisfaisant pour le T.P.I., le complément doit présenter une hémolysine à 100 % à partir du quatrième tube environ. Ce tube, qui contient 0,25 ml de complément dilué au 1/20, représente une dilution de 1/80 à partir du complément considéré pur, soit donc un titre de 80 unités par ml pour le système hématies-hémolysine considéré.

Tel que nous pratiquons le T.P.I. actuellement, nous avons vu que le complément rentre à la dose de 0,1 ml par tube soit un pourcentage de 20 % par rapport au volume total de liquide qui est de 0,5 ml. Ce taux est suffisant puisque, après les 18 heures d'étuve, la présence de complément est encore décelable par addition d'un système hémolytique. Cependant, au début de nos travaux sur le T.P.I., pour nous conformer aux données de Nelson et Mayer, nous ne mettions que 0,05 ml d'alexine par tube, soit 10 % seulement. La modification du milieu de base original de Nelson et, en particulier, l'augmentation du thioglycolate (dont la dose fut quadruplée) entraîna un pouvoir anticomplémentaire accru du milieu, ce qui nous obligea à porter à 20 % le taux de complément dans la réaction. Toutefois, nous devons signaler que, en aucun cas, la quantité de complément ne doit excéder 30 % du volume total, car au-dessus de ce taux, le sérum de cobaye a un certain pouvoir immobilisant par lui-même.

3° CONTROLE DU COMPLÉMENT RÉSIDUEL.

Après la lecture du test, il est indispensable de s'assurer què, pour les sérums donnant un résultat négatif ou douteux, l'absence d'immobilisation ne provient pas de l'insuffisance du complément. Pour vérifier que la réaction s'est effectuée en présence d'une quantité suffisante d'alexine, il convient de rechercher s'il reste encore du complément après la lecture de l'immobilisation. La présence du complément résiduel permet d'affirmer que la dose initiale d'alexine était suffisante. Du fait de la variabilité du pouvoir anticomplémentaire des sérums à examiner, cette vérification doit être pratiquée sur tous les tubes réactions. Cette recherche consiste à ajouter à ces tubes un système hémolytique qui est variable selon la technique adoptée pour le titrage du complément.

a) Contrôle du complément résiduel selon Ledbetter et Martens [63].

Sensibiliser des hématies de mouton dans les mêmes proportions que pour le titrage du complément. Après 30 mn de sensibilisation, à 37 °C ajouter 0,10 ml de cette suspension dans chaque tube réaction avec 0,15 ml de tampon véronal isotonique. Mettre les tubes au B.-M. à 37 °C pendant 30 minutes en agitant toutes les 10 minutes, puis lire le degré d'hémolyse à l'œil nu.

Une hémolyse à ++ correspond environ à 50 % et ce taux est le minimum nécessaire à obtenir pour tous les sérums négatifs ou douteux. Quand il n'est pas atteint, la réaction doit être considérée comme non satisfaisante.

b) Contrôle du complément résiduel suivant notre technique.

Utiliser la même suspension d'hématies de mouton et la même dilution d'hémolysine que pour le titrage du complément selon la technique

de Kolmer. Sensibiliser au préalable les globules rouges pendant 20 minutes à 37 °C en mélangeant volume égal de chaque réactif. Ajouter dans tous les tubes réactions 0,3 ml du mélange ; bien agiter les tubes et mettre au B.-M. à 37 °C pendant 30 minutes. Retirer les tubes du B.M. et lire à l'œil nu le degré d'hémolyse qui doit être de 50 % au minimum (++ sur ++++ environ pour l'appréciation directe).

Avec la dose de 20 % de complément que nous utilisons, nous atteignons, en général, 100 % d'hémolyse pour la plupart des tubes réactions. Le plus fréquemment, l'hémolyse est insuffisante soit avec des sérums infectés, soit avec des sérums très opalescents. De toute façon, les sérums infectés seront rejetés, la réaction n'étant pas valable du fait de l'action possible des germes sur les immobilisines. Les sérums opalescents peuvent, au contraire, être refaits en présence d'une quantité plus grande d'alexine.

E. Mélange gazeux.

Nous avons déjà mentionné, dans le principe de la réaction, que l'extraction des tréponèmes des testicules, de même que l'incubation de la réaction s'effectuaient en anaérobiose, en atmosphère de 95 % d'azote et 5 % de gaz carbonique. Le gaz carbonique joue un rôle dans le maintien de l'équilibre ionique du milieu et on ne peut se dispenser de ce CO₂ bien que ce gaz du commerce contienne toujours, parmi les impuretés, de l'oxygène qui nuit à la survie des tréponèmes. C'est pour cette dernière raison qu'il faut s'assurer que le mélange 95 % d'N + 5 % de CO₂, dont on doit se servir pour le test, ne contienne pas plus de 0,02 % d'oxygène.

Certains laboratoires préfèrent faire passer le mélange gazeux à travers un tube en quartz contenant du cuivre chauffé au rouge pour éliminer au maximum l'oxygène. On peut d'ailleurs contrôler la teneur du mélange en oxygène par barbotage dans du pyrogallol basique qui noircit aux moindres traces de ce gaz.

Nous soulignons que, pour le remplacement de l'air ambiant par le mélange N₂ + CO₂, il est préférable de faire d'abord un vide assez poussé et d'introduire seulement ensuite, le mélange gazeux et, pour plus de précautions encore, répéter cette opération deux ou trois fois, ce que nous faisons régulièrement.

Avant de mettre en incubation les récipients contenant les tubes de réactions, il est utile de laisser une légère surpression de gaz N₂ + CO₂, afin d'éviter une rentrée d'air atmosphérique et, par conséquent, d'oxygène. Toutefois, cette surpression doit être très faible, car, comme l'ont montré Ranque et Depieds [64], une surpression de 0,250 kg par centimètre carré est suffisante pour inhiber fortement l'immobilisation des tréponèmes et nuire ainsi à la sensibilité de la réaction.

CHAPITRE II

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE DE LA RÉACTION

La belle découverte de Nelson et Mayer, concernant la présence des immobilisines antitréponémiques dans le sérum des sujets syphilitiques et des animaux réceptifs à cette infection, rend des services inappréciables sur le plan clinique. Elle a, de plus, suscité de nombreuses et intéressantes recherches auxquelles nous avons apporté une contribution personnelle importante, qui ont fait l'objet de vingt-huit publications tant à l'Académie des sciences, à l'Académie de médecine, qu'à la Société française de microbiologie, la Société de dermato-syphiligraphie et la Société de biologie. Ces recherches concernent, en particulier, la différenciation entre l'anticorps immobilisant et la réagine, la nature de l'immobilisine et le mécanisme de la réaction. Nous nous proposons d'étudier, dans ce présent chapitre, les différents problèmes qui touchent ces sujets.

I. LES ANTICORPS IMMOBILISANTS

A. Différenciation des immobilisines et de la réagine.

Les anticorps immobilisants, que le test de Nelson met en évidence dans le sérum des animaux et des humains atteints de syphilis, sont différents des réagines utilisées dans le séro-diagnostic classique. Ils n'agissent qu'en présence de complément actif, alors que celui-ci n'est pas indispensable, mais au contraire le plus souvent gênant dans les réactions de flocculation par exemple. Ces anticorps qui ne sont pas exclusivement immobilisants, mais aussi tréponémicides, n'ont jamais été mis en évidence, ni chez les sujets normaux, ni chez les individus atteints d'affections autres que la tréponémose. L'ensemble de ces propriétés autorise donc à leur accorder un caractère rigoureusement spécifique. De plus, un certain nombre de faits prouvent que les immobilisines sont radicalement différentes des réagines : d'abord la dissociation possible des deux réactions au cours de l'évolution d'une syphilis traitée ou non ; ensuite le fait qu'il est possible d'absorber la réagine tout en respectant les anticorps immobilisants et enfin, cet autre point, non moins important, à savoir que la réagine isolée du complexe par une solution saline concentrée en présence d'éther (procédé de Davis) n'est pas immobilisante.

La différenciation de la réagine et de l'immobilisine a pu être établie de plusieurs manières :

1^o MÉTHODE D'ABSORPTION DE NELSON ET MAYER [46].

Nelson et Mayer ont décrit dans leur mémoire original la technique suivante d'absorption des réagines :

Préparer une dilution d'antigène de Eagle en mélangeant un volume de la solution alcoolique de l'antigène standard à deux volumes d'eau physiologique. Après mûrissement de 24 heures à 5 °C, centrifuger à 20 000 t/mn pour sédimenter les particules lipidiques, puis ramener au volume original avec de l'eau physiologique. Distribuer cette émulsion dans des tubes par 2 ml et 5 ml, quantités requises pour les deux absorptions successives en présence du sérum et centrifuger à nouveau dans les mêmes conditions. 10 ml d'un mélange de sérums de lapins syphilités sont ajoutés aux sédiments de lipides provenant des 2 ml d'émulsion antigénique, et le tout est agité pendant 10 minutes dans un agitateur de Kahn. Centrifuger alors pendant 30 minutes à 20 000 t/mn pour éliminer les particules de floculation, décanter le sérum et le passer sur un filtre bactériologique pour le débarrasser des plus petits floculats et le stériliser. 5 ml de ce sérum déjà absorbé sont remis en contact avec le sédiment lipidique provenant des 5 ml d'émulsion antigénique, et sont traités comme précédemment. Le sérum est ainsi prêt à être titré.

Le tableau III résume un de ses essais :

TABLEAU III

Nombre d'absorptions à l'antigène de Eagle	Titre en réagine	Dilution du sérum	Pourcentage de mobilité après 8 h à 35 °C
0	16	1/10	0
		1/50	0
		1/250	18
		1/1250	48
1	2	1/10	0
		1/50	2
		1/250	16
		1/1250	50
2	0	1/10	0
		1/50	0
		1/250	14
		1/1250	48

Il résulte que la première absorption par l'antigène de Eagle du sérum de lapins syphilités réduit le titre en réagine de 16 à 2 ; la deuxième absorption élimine toutes traces décelables de réagines. Au contraire, l'activité immobilisante du sérum est pratiquement inchangée après l'éli-

mination des réagines. On peut donc conclure, avec Nelson et Mayer, à l'individualité de ces deux anticorps.

Nous venons de voir que les antigènes lipidiques absorbent uniquement les réagines en respectant les immobilisines. *Ranque* et *Moignoux* [65] ont montré, par ailleurs, que ces dernières étaient absorbables par *Treponema pallidum* tué.

Ils préparent une émulsion tréponémique concentrée (environ 80 spirochètes par champ microscopique) à partir d'une orchite précoce de lapin, dans du sérum normal inactivé de ce même animal. Une première centrifugation à faible vitesse permet d'éliminer les débris cellulaires, les hématies et les spermatozoïdes. Le liquide surnageant est conservé 36 heures à + 5 °C, temps après lequel on s'assure que tous les tréponèmes sont immobiles. La suspension tréponémique est alors centrifugée à 6 000 t/mn pendant 15 minutes ; on obtient un culot constitué de corps spirochéliens.

Des sérums à T.P.I. positif sont traités d'une part avec l'émulsion tréponémique concentrée, laissés en contact pendant 18 heures à la chambre froide, puis centrifugés pour éliminer les tréponèmes. L'autre fraction des mêmes sérums, qui servira de témoin, est conservée dans les mêmes conditions, sans avoir été mise au contact des spirochètes. Le T.P.I. est pratiqué simultanément sur chaque fraction séparée. Les résultats sont consignés dans le tableau IV.

TABLEAU IV

NUMÉRO	FRACTION	IMMOBILISATION (%)
Sérum 198	témoin	98
	saturée	9
Sérum 164	témoin	48
	saturée	0
Sérum M 47	témoin	46
	saturée	0
Sérum M 74	témoin	98
	saturée	11
Sérum 189	témoin	71
	saturée	0

Ces chiffres montrent que la saturation des sérums à T.P.I. positif, par des tréponèmes tués, fait disparaître quasi totalement les immobilisines.

2^o PROCÉDÉ PERSONNEL : MÉTHODE DE SÉPARATION PAR ULTRACENTRIFUGATION [4-7].

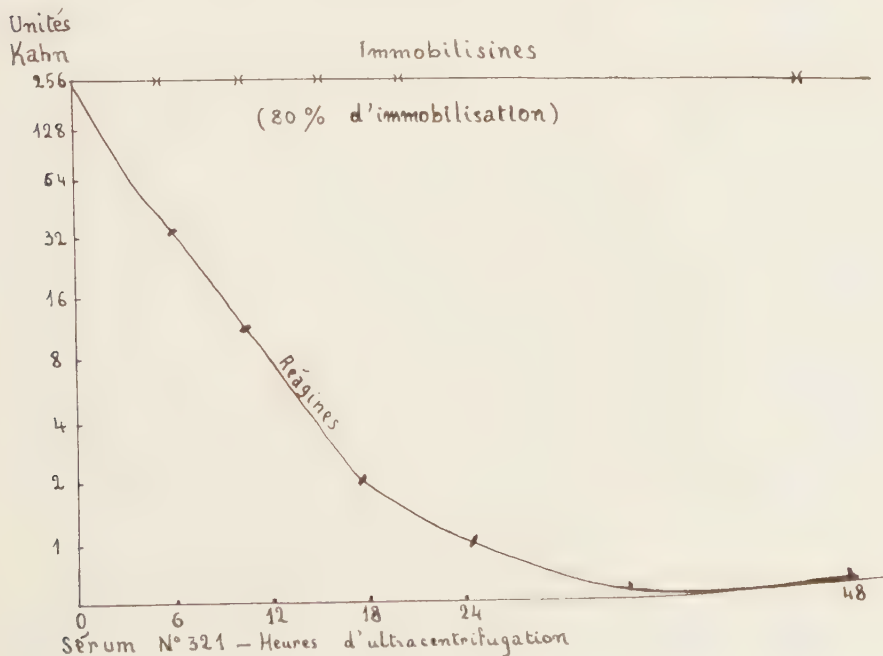
A ce procédé de séparation par adsorption nous avons ajouté une méthode physique, à savoir l'ultracentrifugation à grande vitesse. Nous avons appliqué cette technique à l'étude de la séparation de divers anticorps :

- a) Réagines et immobilisines tréponémiques.
- b) Immobilisines syphilitiques et agglutinines antityphiques.
- c) Immobilisines et hémolysines antimouton.

a) Réagines et immobilisines tréponémiques (4)

V. Deutsch et I. Lominski [66] ont montré que les réagines se déposent plus rapidement que les protéines sériques normales, après une ultracentrifugation de sérums positifs, les transformant ainsi en sérums négatifs.

Nous avons utilisé l'ultracentrifugeuse de Bardet, d'après le principe de Henriot et Huguenard. Le rotor contient six tubes en plastic de 9 mm de diamètre et 21 mm de hauteur. Des sérums présentant des degrés de positivité variés, à la sérologie classique et au T.P.I., ont été soumis à une ultracentrifugation de 80 000 t/mn pendant 6 à 48 heures. Nous avons ensuite comparé le pouvoir immobilisant des sérums non centrifugés et des sérums ultracentrifugés, ainsi que leur teneur en réagines. De plus, nous avons titré les réagines dans le culot de centrifugation repris par un volume d'eau physiologique correspondant au volume



initial de sérum. Les techniques sérologiques utilisées furent celles de Kahn et de Kline quantitatives, de Kolmer et Demanche qualitatives, et enfin le test d'immobilisation des tréponèmes.

RÉSULTATS. — 54 sérums ont été examinés ainsi, soit individuellement, soit en mélange. A titre d'exemple, la courbe précédente représente la sédimentation des réagines en fonction du temps d'ultracentrifugation pour un sérum particulièrement chargé en réagines, mais présentant une immobilisation spécifique à 80 % seulement.

Le tableau V fournit quelques autres exemples de la séparation des réagines et des immobilisines.

TABLEAU V

SÉRUMS	Réactions	Sérum non centrifugé	Sérum ultra-centrifugé pendant 24 h	Culot de centrifugation
N° 323	Kahn	24 unités	2 unités	24 unités
	Kline	4 —	1 —	4 —
	T.P.I.	46 % I.S.	49 % I.S.	
N° 322	Kahn	1 unité	0 unité	1 unité
	Kline	1 —	0 —	1 —
	T.P.I.	59 % I.S.	56 % I.S.	
Mélange des sérums n° 324 et n° 326	Kahn	24 unités	0 unité	24 unités
	Kline	8 —	1 —	8 —
	T.P.I.	100 % I.S.	100 % I.S.	

Il résulte donc de ces expériences que l'ultracentrifugation d'un sérum positif élimine en grande partie ou totalement les réagines syphilitiques de ce sérum. Cette action est en fonction de la durée de l'ultracentrifugation et la totalité des réagines se retrouve dans le culot de centrifugation. Au contraire, le pourcentage d'immobilisation des tréponèmes reste inchangé. Cette constatation met en valeur les différences de comportement de ces deux ordres d'éléments considérés sous l'angle physique.

Il nous a semblé intéressant de répéter ces essais en nous servant des mêmes immobilisines antitréponémiques d'une part, des agglutinines antityphiques et des hémolysines antimouton, de l'autre. Rappelons qu'en ce qui concerne les hémolysines, Paic [67] a montré que l'ultracentrifugation à grande vitesse permettait de déterminer leur constante de sédimentation et de les différencier des autres protéines sériques. Voici l'essentiel de nos nouvelles constatations :

b) Immobilisines syphilitiques et agglutinines antityphiques [7].

Trois lapins (n°s 753, 763, 863) syphilités par voie intratesticulaire, depuis 215 jours, avec la souche tréponémique Gand, et trois autres (n°s 588, 590, 591) injectés depuis 94 jours avec la souche spirochétienne

Nichols, et dont le sérum contenait des immobilisines, ont été inoculés par voie intramusculaire avec des émulsions de bacilles typhiques préalablement chauffées pendant une heure à 70 °C. Chaque animal a reçu trois injections de 2 ml, à des intervalles de 4 et 7 jours.

Le tableau VI résume nos observations concernant les effets de l'ultracentrifugation à 80 000 t/mn appliquée pendant 24 heures sur les immobilisines et les agglutinines contenues dans le sérum des mêmes lapins, 17 et 32 jours après la première injection de bacilles typhiques.

TABLEAU VI

PREMIER TITRAGE AU 17 ^e JOUR APRÈS LA VACCINATION ANTITYPHIQUE								
LAPINS	IMMOBILISINES		AGGLUTININES					
	Avant la centrifugation	Après 24 h de centrifugation	Avant la centrifugation		Liquide surnageant après 24 h de centrifugation		Culot de centrifugation après 24 h	
	o/o	o/o	Antig. H	Antig. O	Antig. H	Antig. O	Antig. H	Antig. O
N° 753.	72	64	1/800	1/1600	0	0	1/800	1/1600
763.	60	57	1/800	1/800	0	0	1/400	1/800
863.	82	87	1/1600	1/3200	1/100	1/200	1/400	1/1600
588.	71	61	1/400	1/1600	0	1/100	1/200	1/400
590.	68	66	1/3200	1/6400	0	1/100	1/3200	1/6400
591.	58	55	1/3200	1/1600	0	1/100	1/3200	1/1600
DEUXIÈME TITRAGE AU 32 ^e JOUR APRÈS LA VACCINATION ANTITYPHIQUE								
N° 753.	56	62	1/800	1/800	1/100	0		
763.	68	64	1/3200	1/1600	0	0		
863.	60	58	1/1600	1/1600	0	1/100		
588.	69	66	1/100	1/800	1/100	0		
590.	62	53	1/1600	1/1600	0	0		
591.	59	66	1/800	1/400	1/200	1/100		

Ce tableau montre que si l'ultracentrifugation a fait disparaître du liquide surnageant les agglutinines (aux taux indiqués dans le tableau), elle n'a exercé aucune influence sur la teneur des sérums en immobilisines. Au surplus, ces agglutinines ont été retrouvées en grande partie sinon en totalité, dans le dépôt de centrifugation.

c) Immobilisines et hémolysines antimouton [7].

Des lapins syphilités par voie intratesticulaire, les uns depuis 109 jours avec la souche tréponémique Gand, les autres injectés depuis 67 jours avec la souche Nichols, et dont le sérum contenait des immobilisines, ont reçu par voie intraveineuse une suspension de globules rouges

de mouton, préalablement lavés cinq fois stérilement à l'eau physiologique. Chaque lapin a reçu trois injections à quatre jours d'intervalle, aux doses décroissantes de 5, 3 puis 2 ml. Les trois lapins injectés par la souche Gand (n^{os} 7, 8 et 10) et les deux lapins syphilités par la souche Nichols (n^{os} 62 et 68) furent saignés le 18^e jour après la première injection de globules rouges de mouton.

Le tableau VII donne les pourcentages d'immobilisation des sérums avant et après ultracentrifugation, et leur titre en unités hémolytiques (par millilitre de sérum) avant et après 6, 12, 18 et 24 heures d'ultracentrifugation.

TABLEAU VII

LAPINS	Immobilisines dans le liquide surnageant		Hémolysines dans le liquide surnageant				Hémolysines dans le culot de centrifugation de 24 h	
	Avant la centrifugation o/o	Après 24 h de centrifugation o/o	Avant la centrifugation	Durée de la centrifugation				
				6 h	12 h	18 h		24 h
N° 7.	52	56	5 000	—	—	—	0	4 500
8.	78	71	1 000	—	—	—	0	1 000
10.	63	56	1 500	250	25	0	0	1 000
62.	66	60	5 000	75	50	0	0	3 500
65.	74	77	4 500	1 000	0	0	0	4 000

Il résulte de ces essais que si la teneur des sérums en immobilisines n'a pas été influencée par l'ultracentrifugation pendant 24 heures, celle des hémolysines a subi une chute déjà dès la 6^e heure de centrifugation, puis s'annule complètement à partir de la 18^e heure. Ces mêmes hémolysines ont été retrouvées dans le culot de centrifugation. L'ultracentrifugation à grande vitesse permet donc de séparer les agglutinines antityphiques et les hémolysines antimouton des immobilisines antitreponémiques contenues dans un même sérum.

CONCLUSION : *De même que Nelson et Mayer ont prouvé, par une méthode d'absorption, que « immobilisines et réagines » sont deux anticorps différents et séparables, nos recherches par la technique d'ultracentrifugation conduisent à la même conclusion et montrent, en plus de leur individualité, que les immobilisines ont un poids moléculaire plus faible que les réagines. Mêmes constatations pour les agglutinines antityphiques et les hémolysines antimouton.*

B. Différenciation entre les immobilisines de la syphilis et celles des autres spirochétoses.

Dans le chapitre précédent, nous avons étudié la différenciation entre les réagines et les immobilisines et nous avons pu conclure à l'individualité de ces deux anticorps.

Nous aborderons maintenant le problème des relations entre les immobilisines de la syphilis et celles des autres spirochétoses humaines, animales et expérimentales.

1° *TREPONEMA PALLIDUM*, *PERTENUE* ET *CUNICULI*.

Nelson, dans son mémoire original, avait déjà signalé l'existence de réactions croisées entre syphilis et pian, lors de la recherche des immobilisines. Avec Khan et Turner [68], ils ont étudié le comportement réciproque des infections à *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue* et *Treponema cuniculi* vis-à-vis de la souche tréponémique Nichols utilisée pour le T.P.I.

Préparation des immun-sérums — Les antisérums correspondant aux souches de *T. pallidum* (Nichols), *T. pertenue* (YA et YD) et *T. cuniculi* ont été obtenus par inoculation de ces spirochètes, par voie intratesticulaire, à des lapins. Ces animaux ont été examinés régulièrement pour déceler l'apparition de l'orchite spécifique qui fut confirmée par recherche des tréponèmes à l'ultramicroscope. En général, l'évolution clinique de l'infection a été semblable avec les spirochètes du pian et ceux de la syphilis. Turner et Nelson ayant montré que le titre des anticorps immobilisants des sérums de lapins syphilitisés expérimentalement atteint un maximum de 3 à 4 mois après l'inoculation, dans la présente expérience, des prélèvements de sang furent faits aux animaux avant l'inoculation puis 4 et 6 mois après, en vue de comparer les taux d'anticorps homologues et hétérologues vis-à-vis de l'antigène Nichols. Quelques animaux furent également saignés au bout de deux mois dans le but de déterminer si, entre les souches ou les espèces, il existait des degrés différents de réactivité croisée, suivant la durée de l'infection et la vitesse de production possible des anticorps.

Quatorze sérums provenant de lapins infectés avec *T. pertenue* et huit sérums de lapins infectés de *T. cuniculi* furent examinés quant à leur activité immobilisante à l'égard de *T. pallidum* (souche Nichols). Tous ces sérums *anti-pertenue* et *anti-cuniculi* ont entraîné une immobilisation marquée des *T. pallidum* dans les conditions expérimentales classiques du T.P.I. Il apparut alors d'importance primordiale de déterminer *sur une base quantitative* le degré de ces réactions croisées. Les premières expériences eurent pour objet de comparer les anticorps anti-cuniculi aux anti-pertenue et anti-pallidum. Les résultats de ces essais initiaux ont mis en évidence une différence tout à fait remarquable dans le degré d'activité immobilisante croisée. Tous les sérums anti-cuniculi ont régulièrement manifesté un titre faible à l'égard des tréponèmes Nichols, de même que vis-à-vis des tréponèmes pertenue, souche YA et YD, pris comme antigène. Par ailleurs, des mêmes antisérums ont présenté des titres 6 à 12 fois supérieurs à l'égard des tréponèmes de souche homologue. Réciproquement, il fut démontré que les sérums anti-pallidum et anti-pertenue n'exerçaient qu'une activité immobilisante très faible vis-à-vis des tréponèmes cuniculi, en dépit de l'activité très élevée de ces mêmes sérums sur les tréponèmes homologues.

En conclusion, pour Khan, Nelson et Turner, il apparaît que, en dépit d'une réactivité croisée significative, il existe une nette différence

antigénique entre *T. cuniculi*, d'une part, et *T. pallidum* et *T. pertenue*, d'autre part.

Nous devons toutefois signaler que, pour notre part, malgré des examens systématiques mensuels de lapins infectés de *Treponema cuniculi* et présentant des lésions intenses, nous n'avons jamais trouvé, dans le sérum de ces animaux, un test positif pour le *Treponema pallidum*. Nos observations ont porté, pour la majorité des lapins, sur une période de un an, et nous n'avons noté qu'un seul cas donnant, à un examen, un résultat douteux, qui se négativa rapidement.

Par contre, les expériences qui suivirent, portant sur les antisérums et les souches de *T. pallidum Nichols*, et *T. pertenue YA* et *YD*, révélèrent des titres immobilisants homologues et hétérologues quantitativement similaires (ou insensiblement plus forts pour la souche homologue) entre ces espèces de tréponèmes. Ces présentes observations relatives à une intense réactivité immobilisante entre *T. pallidum* et *T. pertenue* indiquent que ces deux tréponèmes possèdent une étroite parenté antigénique. D'autres similitudes entre ces deux espèces ont également été observées : manifestations cliniques indifférenciables des lésions testiculaires précoces chez le lapin, temps de survie à peu près semblable dans le milieu de base, à 35 °C, morphologie identique à l'ultramicroscope, immunité croisée évidente, pour ces deux espèces, chez l'animal.

Ainsi, si les différences bien connues qui marquent le tableau clinique du *pian* et de la *syphilis* peuvent être dues à quelques dissemblances antigéniques présentées par leur agent responsable, ces différences ne sont pas décelables par le test d'immobilisation, dans les conditions actuelles de sa réalisation.

Mais, ainsi que de nombreux travaux l'ont fait ressortir, des facteurs tels que le climat, les conditions sociales d'hygiène, les coutumes des populations, le surpeuplement, la porte d'entrée de l'infection, peuvent jouer un rôle primordial en accentuant les différences cliniques entre le *pian* et la *syphilis*.

De plus, il serait bon d'appliquer ce type d'investigation à d'autres infections tréponémiques, telles que le *bejel*, le *pinta*, afin d'obtenir un tableau des relations immunologiques générales existant parmi les diverses tréponématoses dans tout le monde. Il ne semble pas que, jusqu'alors, ce travail ait été réalisé, vu les difficultés d'obtention des souches et des sérums de provenance lointaine.

2° TRÉPONÈMES PALES PATHOGÈNES ET TRÉPONÈMES DE CULTURE.

Une étude similaire d'antisérums, d'une part contre diverses souches de *T. pallidum pathogènes*, et d'autre part, contre les *tréponèmes de culture, avirulents*, a été faite par Khan, Nelson et Turner [68] et par nous-mêmes avec Levaditi, Vaisman et Gastinel.

— SOUCHES PATHOGÈNES : les premiers ont éprouvé les souches pathogènes *MS-1*, *Nichols*, *Saint Louis*, *S-6*; et pour notre part, nous avons comparé les souches *Gand* et *Nichols*. Les résultats de part et d'autre, ont été concordants en montrant une intense réaction croisée entre les diverses souches de *T. pallidum virulents*.

— SOUCHES DE CULTURE : quant aux souches de culture non pathogènes, les chercheurs américains [68] ont éprouvé les sérums de lapins préparés avec des cultures de tréponèmes *Reiter*, *Kazan* et *S.26*, du point de vue de leur activité immobilisante à l'égard de *T. pallidum*, *pertenue* et *cuniculi*, et n'ont observé aucune réactivité croisée entre les tréponèmes pathogènes et ceux de culture. Avec Gastinel et Vaisman nous avons également confirmé l'absence d'immobilisines vis-à-vis de la souche *Nichols*, chez le lapin immunisé avec la souche *Reiter*.

3° LES IMMOBILISINES DANS LES SPIROCHÉTOSES RÉCURRENTIELLES.

Nous venons d'examiner le cas du *pian*, affection due à *T. pertenue*, agent extrêmement voisin de *T. pallidum*, que l'on classe, à l'heure actuelle, dans le même groupe des *tréponématoses* et qui donne un T.P.I. positif à l'égard de la syphilis. Par contre, les tréponèmes de culture apathogènes ne permettent pas l'élaboration d'immobilisines *anti-treponema pallidum*.

Les réactions aux antigènes lipidiques étant positives non seulement dans la syphilis, mais dans des infections diverses et principalement dans les autres spirochétoses, il nous a semblé intéressant de contrôler si de telles affections étaient capables de déclencher la formation d'immobilisines agissant sur le tréponème pâle.

— SPIROCHÉTOSES RÉCURRENTIELLES : l'apparition d'anticorps spirillicides, spirillolytiques et opsonisants dans le sérum d'animaux ou d'humains contaminés par des spirilles récurrentiels, lors du déclenchement de la crise, a été démontrée par Sawtchenko [69], par Levaditi et Roché [70], et, plus récemment, grâce aux recherches entreprises par Constantinesco [71], à l'occasion d'épidémies de fièvre récurrente ayant sévi à Yassy (Roumanie), en 1946. Or, des immobilisines spécifiques capables d'agir sur *Borrelia duttoni* ont été décelées par nous [13] dans le sérum de souris, de rats et de cobayes et dans un sérum humain au cours de l'évolution de la spirillose provoquée par ce parasite. Elles y ont persisté pendant une longue période de temps, leurs effets étant à la fois immobilisants et lytiques.

Ces anticorps sont-ils capables d'agir sur *Treponema pallidum* de la même manière que sur l'agent homologue? En 1952, nous avons cité [12] un cas de spirochétose récurrente chez un sujet ayant une sérologie classique positive et un T.P.I. négatif. De même, Ranque et collaborateurs [72], en 1955, ont constaté un test négatif chez deux sujets infectés par *Borrelia hispanica*, dont un avait une sérologie lipidique positive. Ils ont recherché [72-73] également la présence d'immobilisines antipallida chez des cobayes infectés expérimentalement avec *Borrelia hispanica*. Sur 31 cobayes dont l'infection datait de 24 à 266 jours, les résultats ont été constamment négatifs pour le T.P.I. (à l'exception d'un cas à la limite de la négativité et de la zone douteuse, soit 24 %) avec une sérologie lipidique (Kahn et Kline) positive dans la plupart des cas. Il faut cependant signaler que ces dernières réactions sont parfois positives chez le cobaye en dehors de toute infection spirochétienne.

Il est ainsi démontré que les immobilisines décelées chez les animaux

infectés par *Borrelia* agissent seulement sur ce parasite et qu'il n'existe aucune réaction croisée avec l'agent de la syphilis.

Bien plus encore, la spécificité des immobilisines des *Borrelia* est exclusivement homologue de la souche antigénique [15]. En effet, des sérums *anti-Borrelia hispanica* sont incapables d'immobiliser *Borrelia duttoni* et réciproquement, et cette activité immobilisante strictement homologue, permet de différencier, du point de vue immunologique, les diverses espèces de *Borrelia*. On peut même envisager l'emploi de cette méthode pour identifier des souches tréponémiques morphologiquement semblables, mais biologiquement dissemblables.

Cette étude sur les *Borrelia* permet d'aborder, par analogie, un autre problème très important concernant la syphilis, à savoir : Pour quelles raisons la coexistence entre la présence dans le sérum d'anticorps immobilisants et tréponémicides d'une part, et celle de tréponèmes dans les accidents spécifiques tissulaires d'autre part (gonnues, cerveau de paralytiques généraux, etc.) est-elle une donnée dont la réalité surprend et même étonne ? Dans l'impossibilité où nous nous trouvons d'élucider ce problème dans le cadre de la syphilis pour la raison que nous ne possédons pas de souches tréponémiques isolées au cours des divers stades tardifs de l'infection chez l'homme, il est possible d'avoir recours à l'infection récurrentielle qui se prête facilement à cette étude. On sait en effet que, chez l'animal infecté de récurrente, le sérum contient des anticorps en quantité élevée et que, malgré cela, le cerveau reste virulent pendant toute la vie du sujet.

En 1907, Levaditi et Roché [70] ont constaté que chez le rat contaminé par *Borrelia duttoni*, les parasites survivent dans certains organes entre les crises et disparaissent de la circulation générale, alors que les anticorps apparaissent dans le sang et que leur taux va croissant. Or, les spirilles qui pullulent lors des récidives se révèlent anticorps-résistants *in vitro* comme *in vivo*. Ils sont insensibles à l'égard de ces agents défensifs, leur insensibilité étant transmise héréditairement au cours des passages ultérieurs sur la souris. Ces auteurs ont conclu qu'il s'agissait d'une « accoutumance » aux anticorps de quelques rares spirilles qui échappent à la destruction. Cependant, des recherches entreprises ultérieurement (1909-1910) avec des trypanosomes, ont permis à Levaditi et Muter-milch [74] et à Levaditi et McIntosh [75] d'affirmer que cette accoutumance, pouvant apparaître *in vivo* en cinq minutes, était, en réalité l'effet d'une *sélection* entre de nombreux germes sensibles et de rares parasites résistants dès l'origine (il est possible de retrouver ces derniers dans le dépôt de centrifugation des mélanges d'anticorps et de trypanosomes apparemment dépourvus de parasites indemnes). C'était la première fois que l'on faisait ainsi intervenir la notion de sélection dans le mécanisme de la résistance, notion qui s'est imposée lors des études récentes concernant la création de mutants de bactériacées réfractaires à certains *antibiotiques*, concept actuellement adopté.

La découverte des immobilisines antitréponémiques par Nelson et Mayer nous a engagé à étudier, par la méthode de ces auteurs, le mécanisme de la création [6] des mutants réfractaires de *Borrelia duttoni*

vis-à-vis des anticorps spirillicides, considéré sous l'angle des immobilisines sériques.

TECHNIQUE. — Le sang, la rate et le cerveau de souris infectées depuis trente-trois à deux cent soixante-seize jours sont inoculés à des souris neuves; dès l'apparition de spirilles dans le sang des animaux de passage, on éprouve la résistance de ces parasites vis-à-vis d'un mélange de sérums immobilisants. En ce qui concerne les essais pratiqués sur les rats, nous avons commencé les prélèvements dès le sixième jour de l'infection, c'est-à-dire aussitôt après la première crise et nous avons poursuivi ces prélèvements pendant la rechute et après la disparition définitive des parasites de la circulation. Pour la détermination du pourcentage d'immobilisation, nous avons employé la méthode utilisée dans nos précédents travaux.

RÉSULTATS

a) Apparition de spirilles récurrentiels résistant aux immobilisines sériques au cours de l'évolution de la spirillose provoquée chez le rat et la souris par « Borrelia duttoni ».

1° Rats (V. tableau VIII).

α) Les spirilles contenus dans le sang le 6^e jour de l'infection, pendant l'intervalle qui sépare la première crise de la première rechute, sont immobilisés à 100 % par un sérum « immobilisant-test* ». Ils se comportent donc comme les spirilles de la primo-infection de la souris (même immobilisation à 100 %). *Les parasites sont donc anticorps-réceptifs.*

β) Les spirilles contenus dans le sang, lors de la première rechute survenue le 8^e jour, se sont montrés, dans les mêmes conditions expérimentales, réfractaires aux anticorps immobilisants (immobilisation 0 %).

γ) Le 32^e jour après l'infection, alors que chez deux rats les spirilles n'ont été décelés que par inoculation de la rate et du cerveau, ces spirilles ont offert, après un premier passage sur la souris, une résistance totale aux immobilisines sériques (immobilisation à 0 %).

Les *Borrelia duttoni*, sensibles à l'action immobilisante sérique dans l'intervalle qui sépare la première crise de la première rechute, acquièrent une résistance des plus élevées lors de cette rechute, qui a lieu le 8^e jour. Cette résistance se maintient jusqu'au 32^e jour, temps extrême de nos observations, aussi bien pour les parasites isolés de la rate que du cerveau. Il en résulte que l'infection latente, constatée chez les rats pendant une longue période de temps, est assurée par des germes anticorps-résistants qui, soit sous la forme spirillaire, soit au cours d'une phase infravisible de leur évolution, se dissimulent dans des organes tels que la rate et surtout l'encéphale.

(*) Nous nous sommes servis de sérums de rats contaminés de longue date et fortement immobilisants.

TABLEAU VIII

NOMBRE DE JOURS APRÈS L'INFECTION		POURCENTAGE D'IMMOBILISATION			
		Spirilles isolés de :			Témoin (%)
		sang (%)	rate (%)	cerveau (%)	
6 ^e jour (intervalle première crise et première rechute)	RATS				
	N ^o 1	100	—	—	
	2	100	—	—	100
	3	100	—	—	
8 ^e jour (première rechute)	4	0	—	—	
	5	0	—	—	
	6	0	—	—	100
	7	0	—	—	
32 ^e jour (sang stérilisé)	8	—	0	0	
	9	—	0	0	100
33 ^e jour (un seul passage de sang positif)	SOURIS				
	N ^o 1	0	—	0	100
	2	—	—	0	
118 ^e jour (sang et rate stérilisés)	3	—	—	0	
	4	—	—	0	
	5	—	—	0	100
	6	—	—	0	
276 ^e jour (sang et rate stérilisés)	7	—	—	0	
	8	—	—	0	100

2^o Souris (V. tableau VIII).

Chez une souris, *Borrelia duttoni* a été isolé du sang et de l'encéphale 33 jours après la contamination, et chez une autre du cerveau seulement. Chez quatre sujets, le même isolement a eu comme origine exclusive le névraxe central, 118 jours après l'infection, et chez deux autres sujets, 276 jours après. Tous ces spirochètes isolés d'organes de souris possédant déjà des anticorps sériques en grande quantité, se sont révélés entièrement résistants aux immobilisines *in vitro*.

Les *Borrelia duttoni*, puisés dans la circulation sanguine et surtout dans le cerveau, entre le 33^e et le 276^e jour de l'infection latente, se sont comportés comme des mutants totalement réfractaires (immobilisation : 0 %).

b) *Transmission héréditaire de la résistance de « Borrelia duttoni » aux immobilisines*

(Cf. tableau IX).

Les données condensées dans le tableau IX montrent que les mutants résistants, isolés soit du sang, soit du cerveau de souris ou de rats en

proie à une spirillose latente, datant de 8, 33 et 276 jours, transférés à la souris, ont résisté aux immobilisines sériques lors des 1^{er}, 2^e, 3^e, 5^e et 6^e passages en série. Toutefois, une certaine atténuation du degré de l'état réfractaire à l'égard des immobilisines est apparue au cours de ces transferts. *La résistance est donc transmissible par voie héréditaire.*

TABLEAU IX

SOURCE DES SPIRILLES RÉSISTANTS	NOMBRE de passages sur la souris	POURCENTAGE D'IMMOBILISATION	
		Spirilles résistants à l'origine (%)	Témoins (%)
RAT (Sp. de rechute) (8 ^e jour)	1 ^{er} passage	0	100
	3 ^e —	0	100
	5 ^e —	50	100
	6 ^e —	50	100
	7 ^e —	100	100
SOURIS (Sp. du cerveau) (infection datant de 33 jours)	1 ^{er} passage	0	100
	2 ^e —	65	100
SOURIS (Sp. du cerveau) (infection datant de 276 jours)	1 ^{er} passage	0	100
	3 ^e —	0	100

C'est là une démonstration expérimentale remarquable de la coexistence possible d'une spirillose inapparente et de la présence d'immobilisines humérales. Les récidives, comme d'ailleurs la raison d'être de cette spirillose inapparente, s'expliquent par le fait que des mutants spirillaires résistants sont sélectionnés sous l'impulsion des anticorps antispirillaires, immobilisants et spirillicides.

L'ensemble de ces constatations offre une importance de tout premier ordre lorsqu'on les rapproche de l'évolution polyphasée de l'infection provoquée chez l'homme par *Treponema pallidum*. En effet, dès 1907, Levaditi et Roché ont insisté sur ce rapprochement et formulé les conclusions que voici : « Il est possible que les poussées secondaires et tertiaires qui se produisent au cours de la syphilis, après des périodes d'accalmie plus ou moins longues, s'expliquent par le fait que la pullulation successive des tréponèmes peut fort bien n'être pas la conséquence de la disparition temporaire des anticorps, mais d'une immunisation des parasites vis-à-vis de ces anticorps. »

Conclusion :

Les immobilisines anti-pallidum mises en évidence par le T.P.I. sont donc bien spécifiques du groupe des tréponématoses humaines (syphilis et pian); pour certains auteurs cependant, il existe une réaction croisée de moindre intensité avec le *T. cuniculi*. Les immobilisines produites par les infections récurrentielles n'agissent nullement

sur le *T. pallidum* et même plus, elles sont strictement spécifiques de la souche qui leur a donné naissance (souche de *Borrelia duttoni* ou *Borrelia hispanica*).

C. Pouvoir tréponémicide de l'anticorps immobilisant.

Si Nelson et Mayer se sont attachés au problème de l'action *in vitro* des sérums de spécifique sur *Treponema pallidum*, c'est surtout parce qu'ils travaillent dans le laboratoire de T.B. Turner qui avait montré en 1939 le pouvoir tréponémicide de ces sérums [76]. Le mélange de sérum négatif et de tréponèmes, en inoculation intradermique au lapin, détermine des lésions spécifiques, alors qu'au contraire, le mélange fait avec des sérums syphilitiques se montre avirulent. Turner créait ainsi un test de neutralisation, mais d'application pratique difficile à cause du nombre d'animaux nécessaires et des délais d'observation.

Nous devons ajouter que ce phénomène de l'action des sérums de syphilitiques sur le tréponème avait déjà été observé autrefois par Metchnikoff et Roux qui avaient même tenté d'immuniser des singes contre la syphilis avec de tels mélanges.

Depuis, de nouvelles expériences sont venues confirmer ce pouvoir tréponémicide, principalement celles de Nelson et Mayer, celles de Thompson, Greenberg et Magnuson et nos propres essais avec Levaditi et Vaisman.

a) Nelson et Mayer [46] avaient constaté, au cours d'investigations sur la survie des tréponèmes *in vitro*, que les organismes mobiles gardaient leur virulence. La question se posait de savoir si les spirochètes ayant perdu leur mobilité étaient virulents ou non. Ils résolurent la question et démontrèrent l'action tréponémicide de l'anticorps. Leurs essais peuvent se résumer de la manière suivante :

Ils déterminèrent tout d'abord le pourcentage de tréponèmes mobiles sur les trois mélanges suivants après 16 heures d'incubation à 30 °C.

a) Complément frais + sérum ultrafiltré.....	80 %	T.p. mobiles
b) Complément frais + sérum normal.....	76 %	—
c) Complément frais + sérum de syphilitique...	4 %	—

Le nombre total d'organismes (mobiles + immobiles) est le même dans ces trois mélanges, et est de 5×10^5 ml environ. 0,1 ml de chaque émulsion est injecté par voie intradermique à quatre endroits, sur le dos de deux lapins normaux. Chaque lapin reçoit donc 12 inoculations et cette technique élimine la possibilité de variation dans les réponses d'un animal à l'autre, avec un inoculum de même importance.

Les lapins étant ensuite examinés chaque jour, Nelson observa avec ces trois émulsions des différences importantes, et dans le temps d'incubation, et dans la taille des lésions. Puisque l'on sait que la période d'incubation varie directement avec l'importance de l'inoculum et puisque, dans le cas présent, il y eut le même nombre de parasites inoculés à chaque point, l'auteur conclut qu'une proportion importante de tréponèmes du mélange était non infectieuse et probablement morte. Le tableau X donne les détails des résultats obtenus :

TABLEAU X

LAPIN n°	Émulsion tréponémique incubée 16 h à 30 °C avec :	% de Trép. mobiles	Propor- tion de lésions positives à l'ultra	Temps d'in- cubation (en jours)	Diamètre moyen des lésions) (en mm)
15.92	a) complément + sérum ul- trafiltré	80	4/4	6 à 7	13
	b) complément + sérum nor- mal	76	4/4	6 à 7	13
	c) complément + sérum sy- philitique	4	3/4	13 à 14	3,5
15.93	a) complément + sérum ul- trafiltré	80	4/4	7 à 9	13
	b) complément + sérum nor- mal	76	4/4	7 à 9	11
	c) complément + sérum sy- philitique	4	3/4	19 à 30	1,5

Nelson confirme cette première expérience par l'essai suivant : il prépare deux émulsions tréponémiques, l'une en présence de complément et sérum ultrafiltré et l'autre en présence de complément et sérum de syphilitique. Après 16 heures d'incubation à 35 °C il constate 90 % de mobilité dans la première émulsion et 0 % dans la deuxième. Il injecte 0,1 ml de la première émulsion en quatre points de la région dorsale de trois lapins neufs et fait de même pour la deuxième émulsion avec trois autres animaux.

Le tableau XI résume l'ensemble des observations de l'auteur :

TABLEAU XI

LAPIN n°	Tréponèmes incubés avec :	% de mobilité de l'ino- culum	Propor- tion de lésions positives à l'ultra	Temps d'incu- bation en jours
16.40	complément + sérum ultrafiltré	90	4/4	6
16.41	— — — — —	90	4/4	5 à 6
16.42	— — — — —	90	4/4	5 à 6
16.43	complément + sérum syphilitique...	0	0/4	»
16.44	— — — — —	0	0/4	»
16.45	— — — — —	0	1/4	28

Tous les points inoculés avec l'émulsion présentant 90 % de tréponèmes mobiles développèrent des lésions positives à ultramicroscope dans les 6 jours. Au contraire, avec l'émulsion à 0 % d'organismes

mobiles, seul 1 point sur 12 se révèle positif à l'ultramicroscope et après 28 jours.

Si l'on se base sur la courbe d'infectiosité de Magnuson, Eagle et Fleischman [77], on peut estimer que, dans l'émulsion à 0 % de tréponèmes mobiles, il y avait moins de 500 tréponèmes vivants dans l'inoculum qui représente au total 500 000 parasites. Ainsi, le pourcentage de germes vivants dans un tel inoculum serait de moins de 0,1 %, valeur compatible avec le pourcentage de mobilité observé à la lecture (sur 50 tréponèmes) après l'incubation.

De ces résultats, Nelson et Mayer concluent que les tréponèmes immobilisés par l'anticorps syphilitique en présence de complément, sont non infectieux et probablement morts.

b) Thompson, Greenberg et Magnuson [78], en employant une méthode quantitative et en se mettant dans des conditions expérimentales encore plus rigoureuses, confirment le pouvoir spirochéticide de l'immobilisine. Les résultats de leurs travaux les amènent à supposer l'ordre dans lequel le pouvoir infectieux et la mobilité sont perdus. Le pourcentage de mobilité et le titre infectieux pour le lapin vont de pair pour les dilutions de sérums spécifiques de 1/10, 1/50 et 1/1 250 ; mais pour la dilution intermédiaire de 1/250, la mobilité observée est plus élevée que le pouvoir infectieux estimé *in vivo*. Il est possible que cette dilution représente un point de transition auquel *Treponema pallidum* conserve sa mobilité, mais est devenu non infectieux, soit à la suite de modifications de l'organisme le rendant inapte à la reproduction, soit parce que le parasite devient plus sensible aux moyens de défense de l'hôte. La première des hypothèses semble être la plus plausible, par analogie avec nos constatations sur la dissociation de la mobilité et de la virulence de *Treponema pallidum* soumis au rayonnement ultraviolet [9], de même qu'avec celles de Levaditi, Vaisman et Païc [79] sur *Borrelia recurrentis* et les *trypanosomes*. De même, Eagle et Musselman observèrent que, en présence de pénicilline, le tréponème de souche Reiter perd son pouvoir de multiplication avant de devenir immobile.

c) Devant les conclusions de ces auteurs qui utilisèrent le lapin comme sujet réceptif, il nous a semblé utile d'examiner le problème de l'action spirochéticide de l'immobilisine en nous adressant à la souris comme animal-test [11]. On sait que cet animal, contaminé expérimentalement, réagit par une tréponémose dispersive, mais cliniquement inapparente. La méthode d'imprégnation argentique de Stroesco permet de déceler les tréponèmes sur les coupes histologiques dans les zones électives telles que muqueuse nasale, rectum, peau du dos, périnée, langue, ganglions lymphatiques périphériques, etc.

Nos essais ont porté sur des mélanges de spirochètes et sérum humain normal (T.P.I. négatif) ou sérum humain de syphilitiques (T.P.I. positif), en présence de complément actif ou inactivé. Après 17 heures d'incubation à 35 °C, le pourcentage de mobilité est évalué et des souris sont inoculées par voie sous-cutanée avec 0,5 ml de chaque émulsion, ou de leurs dilutions à 10^{-1} , 10^{-2} et 10^{-3} . Une suspension de ces mêmes spirochètes dans le milieu de Nelson, mais sans adjonction de sérum, sert de témoin de

la virulence. Les souris furent sacrifiées entre le 125^e et le 136^e jour après l'inoculation.

L'examen histologique des zones électives de dispersion tréponémique nous ont amenés aux conclusions suivantes :

1^o Aucune tréponémose microscopiquement apparente n'a été révélée chez les souris inoculées avec des spirochètes immobilisés au taux de 100 %, en présence d'un mélange de deux sérums immobilisants et de complément actif, les inoculations ayant été effectuées avec la suspension concentrée et des dilutions de 10^{-1} à 10^{-3} . Les effets parasitocides sont apparus nettement ; l'immobilisation spécifique a donc traduit une perte de la virulence de *Treponema pallidum*.

2^o Par contre, dans les mélanges des mêmes sérums avec complément inactivé à 56 °C, les tréponèmes, restés mobiles à un taux de 92 %, ont provoqué une parasitose microscopique positive chez 2/2 souris inoculées avec le concentrat, chez 2/3 avec la dilution à 10^{-1} , chez 2/4 avec la dilution à 10^{-2} et chez 1/5 avec la dilution à 10^{-3} .

3^o Tout autres ont été les résultats du mélange des autres sérums humains dépourvus d'immobilisines en présence de complément actif. Dans ce mélange, les spirochètes ont conservé leur mobilité à un taux de 86 %. En effet, les souris inoculées avec le concentrat se sont infectées dans une proportion de 5/5, celles contaminées avec la suspension diluée à 10^{-1} dans une proportion de 2/4, celles qui ont reçu les dilutions à 10^{-2} et 10^{-3} dans une proportion de 0/5. Il en résulte que le tréponème ayant conservé sa mobilité en présence de sérums humains Nelson-négatifs continue à être virulent pour la souris, laquelle réagit par une tréponémose microscopiquement apparente.

4^o Les résultats fournis par le mélange des mêmes sérums avec complément inactivé ont confirmé ceux exposés au paragraphe 3.

5^o Enfin, le transfert chez la souris des spirochètes conservés dans le milieu de Nelson-contrôle, dépourvu de sérums, dans les mêmes conditions que les mélanges examinés précédemment, a fourni des résultats positifs à l'examen microscopique.

Il en ressort que l'utilisation de la souris en tant que test de la virulence, appréciée selon les résultats des examens microscopiques, permet de confirmer les données analogues enregistrées grâce à l'utilisation du transfert au lapin, en ce sens que l'immobilisation de *Treponema pallidum*, réalisée selon la méthode de Nelson, implique une perte de virulence du spirochète. Il va de soi que les sérums humains Nelson-négatifs respectent totalement l'intégrité du pouvoir pathogène du germe.

D. Nature de l'anticorps immobilisant.

1^o MODE DE PRODUCTION DE L'IMMOBILISINE.

L'introduction de tréponèmes dans l'organisme, tant chez l'homme que chez le lapin infecté expérimentalement, déclenche la formation d'immobilisines qui sont décelables par la positivité du test, à partir du 50^e jour de l'infection, soit un peu plus tardivement que les réagines.

Ce délai a été assez bien déterminé dans nos travaux de syphilis expérimentale [14]. Cette positivité, une fois installée, persiste pendant toute la durée de la vie du sujet infecté s'il n'a pas été soumis à un traitement spécifique.

Chez les animaux qui répondent à l'inoculation de tréponèmes, par une infection inapparente, tels que souris ou hamsters, l'apparition de la positivité du test est beaucoup plus tardive, en moyenne 150 à 200 jours après l'infection.

Quand un traitement intervient chez l'homme à une phase tardive de l'infection (à partir de la période tertiaire) le test reste positif quelles que soient la durée et l'intensité de ce traitement, même si la sérologie classique s'est négativée à la suite de la thérapeutique.

Un autre fait important à signaler également, c'est la rapide réapparition de la positivité du test dans les cas de réinfections, aussi bien chez l'homme que chez le lapin, cette remontée des anticorps immobilisants pouvant même souvent précéder la réapparition des réagines.

Enfin, la mise en évidence des immobilisines au cours de l'infection syphilitique a permis de reprendre un certain nombre de problèmes concernant l'immunité dans la syphilis. Parmi ceux-ci, l'un d'eux a été particulièrement étudié, à savoir la réponse de l'organisme à l'inoculation de *Treponema pallidum* tués. Cette méthode expérimentale a été appliquée à maintes reprises et nous ne citerons, dans ce champ d'investigations, que quelques travaux, les plus récents.

Eagle et Fleischman [80], en 1948, peu de temps avant la publication de Nelson sur le test d'immobilisation, communiquent les résultats suivants : des lapins ayant reçu par voie intraveineuse 4 à 38 billions de tréponèmes tués, en suspension aqueuse, ont présenté des réactions de fixation de complément et de floculation aux antigènes lipidiques, fortement positives (titre moyen de 1/96) comparativement aux animaux non infectés pour lesquels le titre de ces réactions reste faible (titre moyen de 1/2). (On sait, en effet, que le lapin neuf donne fréquemment des réactions sérologiques lipidiques faiblement positives, en dehors de toute infection, même celle à *Treponema cuniculi*). Ces titres atteignirent leur valeur maxima en deux semaines, et malgré la continuation des injections immunisantes, ils diminuèrent progressivement, passé ce délai.

Les organismes utilisés dans ces expériences provenaient de chancres testiculaires de lapin et, inévitablement, les suspensions contenaient, avec les spirochètes, une certaine quantité d'extrait tissulaire. Cependant, l'immunisation d'animaux-témoins avec des extraits de testicules normaux donna un résultat négatif quant à la production d'anticorps, et l'inoculation à d'autres sujets de tréponèmes centrifugés, remis en suspension pour éliminer de la sorte la plus grande partie de l'extrait testiculaire, montra le même pouvoir antigénique que l'émulsion grossière de chancres à partir desquels ils avaient été obtenus. La production d'anticorps antilipidiques était donc bien due à *Treponema pallidum*. Pourtant, les antisérums ainsi obtenus ne permettaient pas l'agglutination des suspensions de tréponèmes vivants ou tués, ne donnaient pas de fixation spécifique du complément avec ces suspensions, et n'inhibaient pas le pouvoir infectieux des mêmes tréponèmes vivants. De même, les lapins inoculés avec ces suspensions de tréponèmes tués, même à des

concentrations très fortes et quelle que soit la voie d'introduction dans l'organisme, ne présentaient aucune résistance à une inoculation d'épreuve des mêmes spirochètes vivants et virulents. L'ensemble de ces données montrait que l'injection de tréponèmes tués déclenche seulement la production d'anticorps antilipidiques, alors que l'inoculation de tréponèmes vivants entraîne, en même temps que la formation d'anticorps, l'immunité de l'organisme. Le tréponème tué permet donc de dissocier les deux phénomènes, production d'anticorps et immunisation.

McLeod et Magnuson [81] ont réalisé des essais semblables, mais dans le but de mettre principalement en évidence des anticorps immobilisants après l'injection de tréponèmes tués, tout en contrôlant, à la fin de l'expérience, la réceptivité des animaux à une inoculation de germes virulents. Leur travail a consisté à préparer 13 lapins avec des spirochètes tués par chauffage à 56 °C pendant 40 minutes. Ces animaux reçurent une dose totale variant entre 2 et 8 billions d'organismes en un laps de temps variant entre 7 semaines et 7 mois. Chez 12 de ces lapins, on décéla au moyen du T.P.I. des anticorps immobilisants et un taux élevé de réagines. Celles-ci apparurent plus précocement que les immobilisines, mais s'éliminèrent spontanément plus rapidement. Ces animaux se montrèrent réceptifs à une inoculation intradermique de 200 tréponèmes vivants, ne manifestant donc aucune immunité acquise.

Par ailleurs, *McLeod et Magnuson* administrèrent par voie intrapéritonéale 35 à 190 millions de tréponèmes tués, soit par la chaleur, soit par le mapharsen, à des lapins inoculés de syphilis et traités 1 à 2 ans après par la pénicilline. Le sérum de ces animaux, prélevé avant et après les injections de tréponèmes tués, se montre quatre à huit fois plus riche en immobilisines de même qu'en réagines dans la majorité des cas. Au contraire, des animaux au même stade de l'infection expérimentale, et inoculés avec une suspension de tissu testiculaire normal traité par la chaleur ou le mapharsen, dans les mêmes conditions, ne présentèrent aucune modification de leur titre sérique en anticorps.

On peut donc en conclure que l'injection de tréponèmes tués déclenche la production d'anticorps antilipidiques et la formation d'immobilisines, mais n'entraîne aucun état de résistance pour l'animal à une inoculation des mêmes germes vivants.

Gastinel, Collart et Borel [82-83] ont rapporté des observations analogues en inoculant à des lapins neufs, par voie veineuse, des suspensions de tréponèmes tués par chauffage à 56 °C ou par le formol. La richesse de ces émulsions atteignait 60×10^3 tréponèmes par ml et les animaux reçurent des doses variant entre 0,5 à 1 ml deux fois par semaine à neuf reprises. Leurs résultats peuvent se schématiser ainsi : entre le 21^e et le 34^e jour après la dernière injection préparante, les immobilisines apparurent dans le sérum donnant des réactions variant entre 60 à 100 %. Mais ces anticorps ne furent qu'éphémères et après 1 à 2 mois, leur taux tomba à 17 et 22 % environ. Ces animaux n'avaient acquis aucune immunité cependant, et sont restés réceptifs à l'introduction de l'agent syphilitique.

A côté de ces essais qui aboutirent à des résultats positifs (quoique fugaces) en raison de la forte quantité de spirochètes inoculés, un certain nombre d'auteurs ont constamment échoué dans l'obtention de la pro-

duction d'immobilisines chez l'animal ; sans doute, les quantités de tréponèmes injectés n'étaient-elles pas aussi considérables que dans les travaux précédemment cités, mais elles étaient cependant déjà assez fortes et répétées, comme le montrent nos propres expériences, ainsi que celles de *Waring et Fleming* [84]. Ces derniers, inoculant des lapins avec des tréponèmes tués par lyophilisation, sont arrivés à des conclusions négatives, en ce sens que *Treponema pallidum* dévitalisé, ne confère pas de propriétés immobilisantes au sérum et rend le sujet nullement résistant à une inoculation d'épreuve.

Nos essais avec *Levaditi et Vaisman* ont porté sur les tréponèmes, souche Nichols, tués par la chaleur [10], par le formol [8], ou par les rayons ultraviolets [9].

a) Tréponèmes tués par la chaleur [10].

Des suspensions riches en tréponèmes (souche Nichols) sont chauffées pendant une heure à 56 °C, temps après lequel tous les spirochètes ont perdu leur mobilité. Une telle suspension est inoculée à huit lapins (n^{os} 22 à 31) une première fois par voie intraveineuse et cinq fois par voie intramusculaire à la dose de 2 ml (au total 12 ml) et cela les 9^e, 16^e, 23^e, 50^e et 81^e jours.

Les titrages des immobilisines du sérum sanguin de ces lapins furent pratiqués avant l'inoculation des spirochètes morts, puis aux 21^e, 64^e et 96^e jours. Finalement, 106 jours après la première de ces inoculations, l'épreuve de la réceptivité (immunité tissulaire) par injections sous-sérotales de fragments de syphilome virulent fut réalisée.

Les résultats sont consignés dans le tableau XII.

TABLEAU XII

N ^o des lapins	Test d'immobilisation pratiqué				Le 106 ^e jour épreuve de réceptivité
	avant l'injection (%)	au 21 ^e j (%)	au 64 ^e j (%)	au 96 ^e j (%)	
22....	0	0	0	0	Tous les lapins ont présenté des chancres testiculai- res dans les délais normaux. (2 à 3 semaines après l'injection vi- rulente)
23....	0	0	0	0	
24....	0	0	0	0	
25....	0	0	0	0	
26....	0	0	0	0	
28....	0	0	0	0	
30....	0	0	0	0	
31....	0	0	0	0	

De l'ensemble des données condensées dans ce tableau, on peut conclure que les tréponèmes tués par la chaleur, aux concentrations utilisées, ne sont nullement antigéniques.

b) Tréponèmes tués par le formol [8].

A une émulsion de spirochètes (souche Nichols) dans l'eau physiologique, on ajoute du formol dans la proportion de 0,075 ml pour 100 ml

de cette émulsion. On injecte à sept lapins (nos 40 à 47), par voie intramusculaire, 2 ml de mélange formol-tréponèmes (lesquels sont immobiles) à six reprises différentes, soit le 1^{er}, le 6^e, le 23^e, le 31^e, le 40^e et le 70^e jour. Titrage des immobilisines sériques avant la première de ces inoculations, puis le 34^e, le 60^e et le 90^e jour après. Finalement, le 96^e jour, épreuve de réceptivité par inoculation sous-scutal de fragments de syphilome virulent (immunité tissulaire).

Les résultats sont consignés dans le tableau XIII.

TABLEAU XIII

N ^o des lapins	Test d'immobilisation pratiqué				Le 106 ^e jour épreuve de réceptivité
	avant l'injection (%)	au 21 ^e j (%)	au 64 ^e j (%)	au 96 ^e j (%)	
40....	0	0	0	0	Tous les lapins ont présenté des chancres testiculai- res dans les délais normaux. (2 à 3 semaines après l'injection vi- rulente)
41....	0	0	0	0	
42....	0	0	0	0	
43....	0	0	0	0	
44....	0	0	0	0	
45....	0	0	0	0	
47....	0	0	0	0	

Ici encore, on constate un échec total dans la production d'anticorps immobilisants.

c) Tréponèmes tués par le rayonnement ultraviolet [9].

Une suspension de *Treponema pallidum* (souche Nichols) est centrifugée pendant cinq minutes à 2 000 t/mn (clarification). 10 ml de cette suspension sont versés dans des boîtes de Petri (diamètre 10 cm). Irradiation au moyen d'une lampe Mazda ; longueur du tube : 30 cm ; distance : 52 cm ; puissance : 30 ergs/mm²/s. Cette irradiation a été effectuée par les soins de M. Latarjet, auquel nous adressons nos plus vifs remerciements. L'effet dévitalisant du rayonnement ultraviolet a été précisé dans notre laboratoire.

Nous avons examiné :

1^o L'intensité de l'action dévitalisante du rayonnement U.V. après une exposition de 5, 10 et 30 minutes, au moyen de l'examen de la mobilité des tréponèmes, des effets de leur transfert intratesticulaire à des lapins et de la virulence des ganglions poplités de ces lapins, évaluée 109 jours après ce transfert.

2^o Le pouvoir immunisant des spirochètes irradiés et l'apparition des immobilisines sériques, titrée selon la méthode de Nelson et Mayer.

Le tableau XIV résume les résultats des essais se rapportant au premier point.

TABLEAU XIV
EFFET TRÉPONÉMICIDE DU RAYONNEMENT U.V.

RAYONNEMENT U. V.	MOBILITÉ des tréponèmes	VIRULENCE POUR LE LAPIN		
		Numéro des lapins	Résultat de l'inoculation intratesticulaire	Transfert des ganglions poplités au 109 ^e jour après l'épreuve
Durée : 30 minutes soit : 54 000 ergs/mm ²	Immobiles	6 7 8 9	négatif id. id. id.	négatif id. id. id.
Durée : 10 minutes soit : 18 000 ergs/mm ²	Mobiles	10 11 12	négatif id. id.	négatif id. id.
Durée : 5 minutes soit : 9 000 ergs/mm ²	Mobiles	14 15 16 17	Orchite au 40 ^e j id. id. id.	
Témoin	Mobiles	18 19 20 21	Orchite au 17 ^e j id. id. id.	

Il résulte des données condensées dans le tableau XIV que la dose de 18 000 ergs/mm² (exposition pendant 10 mn) supprime le pouvoir chancreux de *Treponema pallidum* et sa propagation dans le système lymphatique poplité, tout en respectant sa mobilité. C'est un des exemples de la dissociation entre le pouvoir pathogène, d'une part, la mobilité des parasites, de l'autre. Une exposition pendant 30 minutes (dose de rayonnement : 54 000 ergs/mm²) se comporte de même, mais fait perdre aux spirochètes leur mobilité. Par contre, irradiés pendant 5 minutes (durée de rayonnement : 9 000 ergs/mm²), les spirochètes conservent leur mobilité et leur pouvoir chancreux ; ils se comportent donc comme les parasites témoins, non irradiés.

Le tableau XV se réfère au deuxième point :

Les lapins utilisés dans cette seconde série d'essais ont reçu, par injection intramusculaire, 6 ml de suspension tréponémique irradiée aux doses indiquées dans ce tableau (soit 30 minutes et 54 000 ergs, 20 minutes et 36 000 ergs et 10 minutes et 18 000 ergs) à trois reprises différentes (le 1^{er}, le 7^e et le 14^e jour). Examen de la virulence des ganglions poplités le 51^e jour et recherche des immobilisines sériques le 96^e jour. L'épreuve de la réceptivité à l'égard des spirochètes virulents a été effectuée le 98^e jour et le test de Nelson le 38^e jour après cette inoculation d'épreuve.

Le tableau XV montre que la virulence du système lymphatique

a été nulle 51 jours après la première inoculation vaccinnante et que le test de Nelson s'est révélé totalement négatif chez tous les lapins utilisés. La réceptivité vis-à-vis de tréponèmes virulents s'est montrée normale (apparition de syphilomes testiculaires le 15^e jour). Quant au test de Nelson, il devient positif dans les délais normaux après l'épreuve de réceptivité.

TABLEAU XV

POUVOIR VACCINANT DES TRÉPONÈMES IRRADIÉS ET TEST DE NELSON.

RAYONNEMENT U. V.	NUMÉRO des lapins	RÉSULTATS		ÉPREUVE DE RÉCEPTIVITÉ le 98 ^e jour
		Virulence des ganglions poplités le 51 ^e jour	Test de Nelson le 87 ^e jour (%)	Apparition de chancres
30 minutes 54 000 ergs/mm ²	6	négatif	0	15 ^e jour
	7	id.	0	id.
	9	id.	0	id.
20 minutes 36 000 ergs/mm ²	80	négatif	0	15 ^e jour
	81	id.	0	id.
	82	id.	0	id.
	83	id.	0	id.
10 minutes 18 000 ergs/mm ²	10	négatif	0	15 ^e jour
	11	id.	0	id.
	12	id.	0	id.

CONCLUSION : L'introduction dans l'organisme de tréponèmes vivants entraîne la formation d'immobilisines sériques. Par contre, l'injection de tréponèmes tués ne déclenche pas la production d'anticorps immobilisants, sauf dans des cas d'injections massives et répétées à courts intervalles. Même dans ce dernier cas, les taux d'immobilisines sont relativement faibles et éphémères. De plus, le tréponème vivant entraîne chez l'animal l'établissement d'une immunité le rendant réfractaire à la réinoculation tandis que les tréponèmes tués ne produisent aucune immunité et l'animal se comporte comme un sujet neuf à la réinoculation d'épreuve.

2° THERMOSTABILITÉ DE L'IMMOBILISINE.

Nelson et Mayer rapportent les essais suivants :

Cinq échantillons d'un mélange de sérums de lapins syphilités expérimentalement furent soumis pendant 30 mn aux températures de 56 °C, 60 °C, 64 °C et 68 °C respectivement. Chaque échantillon, après ce chauffage, fut titré par la méthode de floculation de Eagle pour leur taux

de réagines, et par la technique quantitative d'immobilisation des tréponèmes.

TABLEAU XVI

Sérum de lapin chauffé	Titre en réagine	Dilution finale du sérum	Pourcentage de tréponèmes mobiles après incubation à 35 °C	
			8 heures	16 heures
56 °C - 30 m.	4	1/10	10	2
		1/30	30	18
		1/90	54	18
60 °C - 30 m.	3	1/10	12	6
		1/30	30	12
		1/90	54	18
64 °C - 30 m.	1	1/10	10	2
		1/30	30	14
		1/90	54	14
68 °C - 30 m.	0	1/10	14	2
		1/30	46	12
		1/90	60	16
Non chauffé.....	«	1/10	14	2
		1/30	20	10
		1/90	50	14

Les résultats consignés dans le tableau XVI montrent que si le taux des réagines diminue avec l'intensité du chauffage, le pourcentage d'immobilisation reste inchangé.

Dans une autre série d'essais, la température de chauffage du sérum fut encore plus augmentée et atteignit 70 °C et 72 °C pendant 15 minutes. Ici encore, l'activité immobilisante ne parut pas influencée, puisque les mêmes taux furent retrouvés. Bien qu'une semblable thermostabilité soit peu fréquente pour les anticorps en général, des constatations analogues ont déjà été rapportées par *Jones* [85], pour l'anticorps agglutinant du sérum de lapin contre le bacille du choléra du chien, anticorps qui résiste même à un chauffage de 20 minutes à 90 °C. D'autres exemples ont également été fournis par *Marrack* [86].

Harris, Portnoy, Falcone et Olansky [87] constatent également que l'immobilisine se conserve mieux que la réagine, et confirment que l'anticorps immobilisant est stable à 72 °C pendant 15 mn aussi bien qu'à — 20 °C ou 37 °C pendant 6 semaines. Ces dernières constatations sont valables pour les sérums conservés à l'état lyophilisé ou liquide tandis que les réagines, soumises aux mêmes conditions, ne présentent une bonne conservation qu'à l'état lyophilisé.

Lawrence E. Baron [88], d'autre part, observe que l'anticorps immobilisant résiste également à un chauffage de 170 mn à 56 °C.

Ainsi se trouve démontrée la remarquable thermostabilité des immobilisines qui est de beaucoup supérieure à celle des réagines.

3° COMPORTEMENT DE L'IMMOBILISINE DANS LES FRACTIONNEMENTS PROTÉINIQUES.

Magnuson et Thompson [47], au cours de leur étude sur la différenciation entre l'immobilisine et la réagine, établirent que le premier de ces anticorps est non dialysable et se situe dans la fraction globulinique du sérum. En employant la méthode VI de Cohn, de séparation par l'alcool, les auteurs montrent que la presque totalité de l'activité immobilisante se retrouve dans les fractions II-III qui correspondent aux β et γ globulines.

Avec la collaboration de *M. Grabar*, nous avons confirmé par l'électrophorèse sur papier la localisation de l'immobilisine dans les mêmes β et γ globulines.

En ce qui concerne la place des réagines au cours des fractionnements électrophorétiques, un travail très important vient d'être fait par *Anna-Brita Laurell* [89], à l'Institut bactériologique de l'université de Lund (Suède).

Le fait le plus remarquable qui ressort de cette étude est la localisation différente des réagines suivant les phases de la syphilis. L'auteur, soumettant à l'électrophorèse sur papier des sérums de syphilitiques aux divers stades d'évolution de la maladie, constate que :

- dans la syphilis primaire, les réagines se trouvent dans la zone des γ globulines;
- dans la syphilis secondaire, elles migrent vers les β globulines, occupant les deux zones γ et β 2;
- et dans la syphilis latente ou ancienne, on retrouve les réagines dans la zone des β 2 globulines presque en totalité, avec seulement des traces en γ .

Ces différences dans la place qu'occupe l'anticorps sont également constatables dans l'immunisation du cheval avec des pneumocoques; ces variations sont en rapport direct avec la durée de l'infection, et peut-être pourrait-on faire un rapprochement entre la migration de ces anticorps et la localisation de l'infection à son début ou sa généralité plus tardive.

D'autre part, les γ globulines purifiées préparées à partir d'un sérum humain normal, donnent des réactions de Kahn et des réactions de fixation de complément positives avec les antigènes lipidiques bruts, mais moins fréquemment avec les antigènes cardiolipidiques. La substance inhibitrice de Neurath empêche la floculation de ces globulines dans la réaction de Kahn, alors qu'elle est augmentée par l'addition d'albumine humaine purifiée. De même que les sérums spécifiques, les sérums de fausses réactions positives donnent le même fractionnement dans les deux zones des γ et β 2 globulines.

Il résulte de l'ensemble de ces recherches que les immobilisines et les réagines se situent dans les mêmes β et γ globulines. Ce sont cependant deux anticorps différents, comme l'ont prouvé l'étude de leur poids moléculaire relatif, ainsi que leur possibilité de séparation soit par la méthode d'absorption lipidique, soit par l'ultracentrifugation.

II. CINÉTIQUE DE LA RÉACTION D'IMMOBILISATION

Dans ce chapitre, nous nous proposons d'étudier l'influence des facteurs : temps, température et concentration en complément, sur l'intensité de l'immobilisation des tréponèmes.

A. Variation de l'immobilisation en fonction du temps d'incubation.

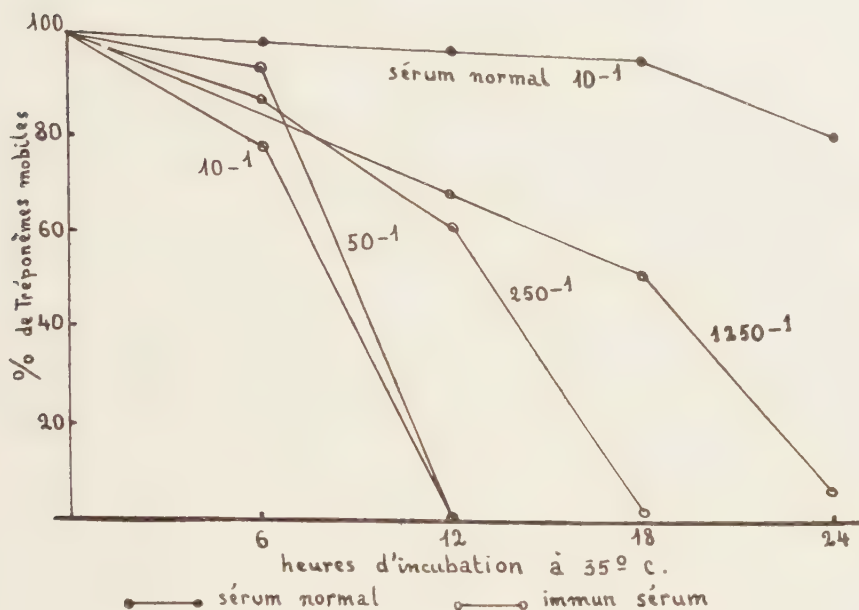
Dès les premières recherches de Nelson sur l'action des sérums spécifiques vis-à-vis des tréponèmes maintenus en survie *in vitro*, l'auteur constata que l'immobilisation ne se manifestait pas immédiatement, mais qu'elle débutait, au plus tôt, 5 heures après le contact entre l'antigène et l'anticorps, et souvent même plus tardivement. Le tableau XVII relate un de ses essais :

TABLEAU XVII

MÉLANGE DE SÉRUM N°	DILUTION FINALE DU SÉRUM	POURCENTAGE DE TRÉPONÈMES MOBILES	
		après 8 h d'incubation	après 16 h d'incubation
1	témoin	90	78
	1/10	12	0
	1/30	20	0
	1/90	42	2
	1/270	60	6
2	témoin	90	80
	1/10	6	0
	1/30	22	0
	1/90	40	2
	1/270	60	8
3	témoin	90	80
	1/10	22	4
	1/30	40	10
	1/90	50	22
	1/270	72	40

La lecture de ce tableau montre que le pourcentage de tréponèmes mobiles diminue avec le temps d'incubation ; cette différence est très frappante entre les deux lectures de 8 heures et 16 heures, et encore plus marquée dans les dilutions des sérums.

Magnuson et Thompson [47], d'autre part, ont plus approfondi cette étude qui est condensée dans le graphique suivant :



Ainsi qu'on peut le constater, en présence de sérum négatif, le pourcentage de mobilité diminue très peu et même d'une façon négligeable, en 24 heures ; au contraire, le sérum positif étudié à différentes dilutions, ne présente, après 6 heures d'incubation, qu'une immobilisation très faible, alors qu'à la 12^e heure, pour le sérum dilué au 1/10 et 1/50 elle est déjà totale ; mais on voit que 18 à 24 heures sont nécessaires pour atteindre le même taux avec les dilutions plus grandes. C'est l'ensemble de ces constatations qui permet de fixer la lecture de la réaction entre 18 et 24 heures d'incubation.

La longue durée d'incubation nécessaire à 35 °C entraîne pour le complément une forte diminution de son activité et il est possible que, de ce fait, l'immobilisation reste incomplètement achevée. Comme nous l'avons déjà mentionné, il est indispensable de rechercher le complément résiduel après la lecture par l'addition d'un système hémolytique, afin de s'assurer que la quantité de complément initiale était suffisante.

Certains auteurs, afin de parer à cette destruction de l'alexine pendant l'incubation, ont remédié à cet inconvénient soit en introduisant le complément dans la réaction en deux temps (à l'heure 0 et à la 12^e heure) soit en employant une technique de présensibilisation.

Mayer, Barron et Seldeen ont étudié en détail la cinétique de la réaction et les avantages de la présensibilisation. Ils ont réalisé l'essai

suivant : trois suspensions de tréponèmes de richesse variée, 24 millions, 4,8 millions et 0,9 millions de tréponèmes par ml sont mises en présence de l'anticorps pendant 18, 22 et 28 heures. Le complément est ajouté seulement après ces temps de présensibilisation. Pour chaque mélange, trois lectures sont effectuées après des délais de 2, 4 et 6 heures. Ces auteurs ne constatèrent aucune variation entre la présensibilisation de 22 et 28 heures, ni suivant la richesse de l'émulsion, ni selon le délai des trois lectures. Au contraire, après 18 heures de présensibilisation, les taux d'immobilisation furent plus faibles. Ils en conclurent que la sensibilisation optima nécessite environ 22 heures, d'où le choix de ce délai pour la lecture du test d'immobilisation.

B. Influence de la température d'incubation sur la vitesse de l'immobilisation.

Nelson et Mayer ont soumis un sérum positif à trois dilutions différentes au test d'immobilisation, en plaçant les tubes, pour la période d'incubation, aux températures de 25°, 30°, 35° et 40 °C respectivement. Les résultats de la lecture faite après 4, 8 et 16 heures sont consignés dans le tableau XVIII :

TABLEAU XVIII

TEMPÉRATURE D'INCUBATION	DILUTION FINALE DU SÉRUM	POURCENTAGE DE TRÉPONÈMES MOBILES		
		après 4 h d'incubation	après 8 h d'incubation	après 16 h d'incubation
25 °C	1/10	94	80	30
	1/30	96	90	60
	1/90	96	96	70
	témoin	94	96	90
30 °C	1/10	80	20	0
	1/30	94	30	0
	1/90	96	50	2
	témoin	96	94	88
35 °C	1/10	10	0	0
	1/30	40	10	0
	1/90	70	20	0
	témoin	94	90	92
40 °C	1/10	0		
	1/30	0		
	1/90	0		
	témoin	50		

On peut ainsi constater que la sensibilité de la réaction augmente avec la température, pour atteindre le maximum à 35 °C. Au-dessus de cette température (40 °C), déjà après 4 heures, les dilutions du sérum

positif présentent une immobilisation totale, mais du fait que le témoin ne donne plus que 50 % de mobilité, cette température ne peut être retenue comme favorable pour l'exécution du test. C'est la raison pour laquelle on adopte, d'une façon générale, les 35 °C pour l'incubation du T.P.I.

C. Rôle du complément sur l'immobilisation des tréponèmes.

1° NÉCESSITÉ DU COMPLÉMENT.

Nous avons vu que l'immobilisation des tréponèmes ne pouvait avoir lieu qu'en présence de complément. Les preuves de cette nécessité ont été apportées par Nelson et Mayer par les deux expériences suivantes : la première consistant à décomplémenter le sérum de cobaye par chauffage à 56 °C pendant 30 minutes, procédé employé d'ailleurs dans la pratique courante, puisque chaque sérum comporte un tube témoin avec sérum de cobaye chauffé; la deuxième méthode consistant à adsorber l'alexine sur un complexe antigène-anticorps; les auteurs ont réalisé cette adsorption de la manière suivante : 5 ml de sérum de cobaye frais sont mis en présence d'un précipité résultant du contact entre de l'albumine d'œuf et un sérum de lapin antialbumine d'œuf. Le mélange est laissé en contact pendant 24 heures à + 5 °C en agitant de temps à autre, puis le précipité est éliminé par centrifugation. Le liquide surnageant est stérilisé par filtration et se trouve dépourvu de son pouvoir alexique.

Le tableau XIX résume les résultats obtenus avec le sérum de cobaye traité selon ces deux procédés :

TABLEAU XIX

SÉRUM DE COBAYE (dilution finale au 1/20)	POURCENTAGE DE TRÉPONÈMES MOBILES après 8 h d'incubation à 35 °C		
	Sérum syphilitique dilué au 1/10	Sérum syphilitique dilué au 1/50	Sérum négatif
Frais non traité.....	6	24	86
Inactivé par la chaleur.....	86	86	86
Décomplémenté par adsorption.	84	86	90
Témoin eau physiologique sans sérum de cobaye	90	88	90

Il montre que l'inactivation par la chaleur et l'adsorption sur un complexe antigène-anticorps, rendent le sérum de cobaye incapable d'immobiliser les tréponèmes pâles en présence de sérum syphilitique, ce qui prouve que le « complément » est le *facteur indispensable* qui conditionne le phénomène d'immobilisation.

2° INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN COMPLÉMENT.

Dans le but de déterminer la concentration optima de complément à introduire dans la réaction, les titrages suivants furent réalisés dans

lesquels la dilution finale du complément s'échelonne entre 1/10 et 1/80, en présence de trois dilutions de sérums positifs, celles-ci permettant de mieux apprécier les variations de l'immobilisation.

Le tableau XX condense les résultats obtenus :

TABLEAU XX

DILUTION FINALE DU COMPLÉMENT (sérum de cobaye)	DILUTION FINALE DU SÉRUM	POURCENTAGE DE TRÉPONÈMES MOBILES après incubation à 35 °C	
		4 heures	8 heures
0	1/10	96	94
	1/50	90	94
	1/250	94	92
	témoin	94	92
1/80	1/10	64	12
	1/50	94	54
	1/250	96	80
	témoin	94	92
1/40	1/10	58	2
	1/50	84	18
	1/250	94	70
	témoin	94	94
1/20	1/10	58	0
	1/50	84	4
	1/250	96	64
	témoin	96	90
1/10	1/10	56	0
	1/50	78	0
	1/250	92	56
	témoin	90	92

On constate ainsi de nouveau que, d'une part, le complément est indispensable pour que l'immobilisation se manifeste, et que, d'autre part, la sensibilité de la réaction augmente avec la quantité de complément, le maximum étant atteint avec les dilutions de 1/10 à 1/20. Ce sont là les constatations de Nelson et Mayer qui prouvent que le complément dilué au 1/20 est suffisant pour obtenir une bonne sensibilité du T.P.I.

De leur côté, *Magnuson et Thompson* [47] sont arrivés à un résultat très voisin, et trouvent la dilution finale de 1/18 suffisante ainsi que le démontre le protocole suivant (tableau XXI).

TABLEAU XXI

	CONCENTRATION FINALE	COMPLÉMENT FRAIS					COMPLÉMENT INACTIVÉ à 56 °C				
		1/9	1/18	1/36	1/72	0	1/9	1/18	1/36	1/72	0
Sérum humain normal dilué au :	1/10	98	84	100	90	100	84	98	94	94	100
	1/40	98	98	96	84	100	96	98	94	96	96
	1/160	88	88	98	98	98	98	98	90	84	92
	1/640	86	98	94	98	96	98	98	88	94	98
	0	96	92	80	82	80	88	96	98	94	80
Sérum humain syphilitique dilué au :	1/10	0	0	10	22	80	76	74	64	88	92
	1/40	0	10	42	82	88	92	100	92	0	92
	1/160	48	38	78	96	98	96	94	92	100	96
	1/640	82	88	76	84	86	94	100	88	88	96
	0	100	88	94	90	86	98	92	94	98	84
Lecture du pourcentage de tréponèmes mobiles faite après 16 heures d'incubation à 35 °C.											

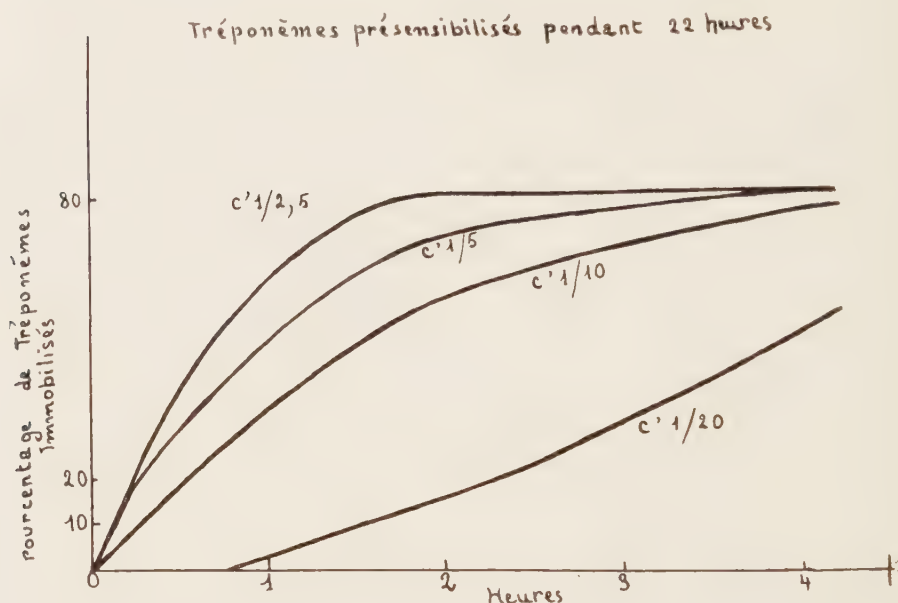
A la lumière de ces recherches, la dose de complément à utiliser dans la réaction fut fixée à 10 % par rapport au volume final. Cette dose représentait même un excès d'alexine, excès indispensable pour la mise en évidence du complément résiduel après la lecture à l'ultramicroscope.

Les études de Nelson, de même que celles de Magnuson, sur la dose de complément nécessaire à la réaction ont porté sur le temps maximum d'incubation de 16 heures. Or, certains auteurs estiment que l'immobilisation n'a pas toujours atteint son maxima après ce temps et préconisent une incubation plus longue jusqu'à 36 heures et même 48 heures. Cette prolongation du temps d'incubation nécessite ou bien une forte augmentation du taux de complément, ou son introduction en deux temps, ou bien encore en un seul temps, mais après une période de présensibilisation (contact antigène-anticorps seulement) plus ou moins prolongée.

Nous avons vu que cette présensibilisation a été étudiée par *Mayer, Barron et Seldeen* [173] qui ont établi que la lenteur de la réaction résulte, dans une large mesure, d'un retard considérable dans la sensibilisation des tréponèmes par l'anticorps, et en déduisirent que la sensibilisation optima prenait environ 22 heures. Ceci établi, ils étudièrent l'influence de la concentration en complément sur l'immobilisation après présensibilisation.

Dans une première expérience, le complément fut ajouté aux concen-

trations de 1/2,5, 1/5, 1/10 et 1/20, après 22 heures de contact entre l'antigène et l'anticorps. La lecture faite, 1, 2, 3 et 4 heures après l'addition du complément, a permis d'établir les courbes ci-dessous :

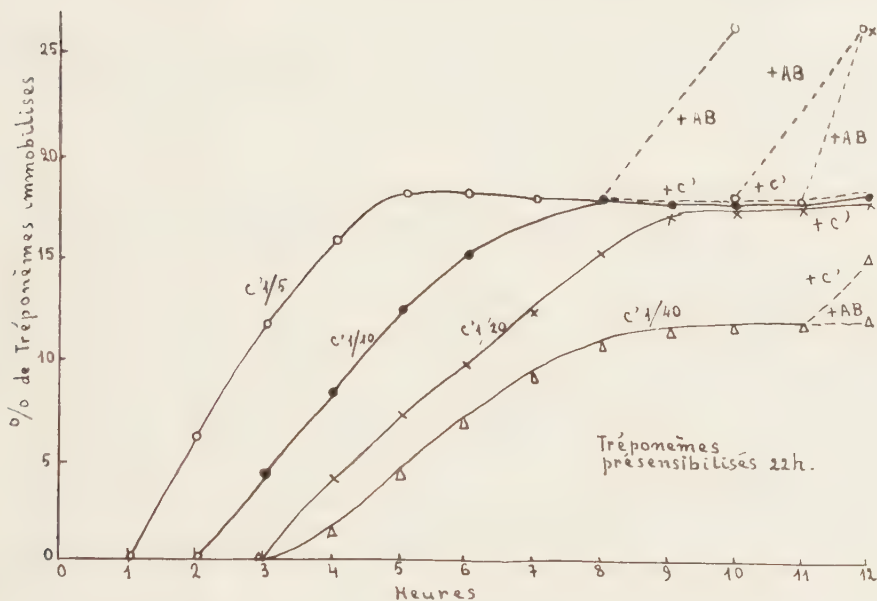


Ainsi qu'on peut s'en rendre compte, la vitesse d'immobilisation augmente avec la concentration du complément dans les premières heures, mais le même taux final est atteint à la 4^e heure pour les trois plus fortes concentrations. Afin de mieux apprécier l'importance de ces facteurs temps et concentrations en complément, une deuxième expérience fut faite avec un immunsérum de titre très faible (environ 20 % d'immobilisation spécifique), le complément étant ajouté après 22 heures de présensibilisation, aux concentrations de 1/5, 1/10, 1/20 et 1/40. Une lecture faite toutes les heures jusqu'à la 12^e heure donna les résultats suivants :

Les 20 % d'immobilisation furent atteints en 5 heures avec le complément dilué au 1/5, en 6 heures avec celui au 1/10 et en 7 heures avec celui en 1/20. Mais avec la dilution de 1/40 le point final obtenu n'est que de 12 %, même après 12 heures d'incubation. Dans ce dernier cas, le complément était donc insuffisant pour mener la réaction à son terme.

Pour s'assurer que l'immobilisation avait atteint son point final en présence de ces différentes dilutions d'alexine, les auteurs ajoutèrent dans les tubes, après que le titre maximum ait été atteint, soit une nouvelle dose de complément au 1/10, soit une quantité supplémentaire d'anticorps (sérum dilué).

Ainsi que le montre la figure suivante, et pour les trois plus fortes concentrations en complément, de l'addition d'anticorps (+ AB), il résulte une augmentation du taux d'immobilisation, preuve de l'existence d'un excès de complément libre. Par contre, l'addition de complément (+ C') laisse le taux d'immobilisation inchangé, démontrant ainsi que le point final de la réaction était atteint. Au contraire, dans les tubes contenant le complément au 1/40, l'inverse se produit, mettant ainsi en évidence l'insuffisance de ce dernier pour mener la réaction à son terme.



Ces expériences confirment donc que l'immobilisation s'effectue à des vitesses qui varient avec la concentration en complément, mais que le point final atteint est le même dans la mesure où il reste du complément libre en réaction.

On peut se demander pourquoi la fixation de l'anticorps immobilisant sur les tréponèmes est si lente? Une réponse semble pouvoir être apportée à ce problème, en effectuant la réaction non pas avec un antigène préparé extemporanément, mais avec une suspension de tréponèmes préparée de la veille et maintenue en anaérobiose dans le milieu de survie. On constate, dans ces dernières conditions, que l'immobilisation se manifeste très rapidement. Il y aurait donc un facteur inconnu qui retarderait l'union antigène-anticorps, et qui disparaîtrait par le vieillissement de la suspension de tréponèmes.

De l'ensemble de ces essais, il résulte que l'augmentation de la dose de complément accélère l'immobilisation et en augmente le taux. Cependant, il n'est pas sans inconvénient de trop augmenter cette concentration en alexine [90], car à partir de 35 %, on observe une action immobilisante

du complément lui-même, constatations faites par tous ceux qui pratiquent le T.P.I. et que nous avons vérifiée nous-mêmes à plusieurs reprises.

En conclusion, la dose de 10 % est suffisante pour la presque totalité des sérums, mais comme il n'y a aucun inconvénient à augmenter cette concentration, à condition qu'elle n'excède pas 35 %, et pour éviter les résultats non satisfaisants avec les sérums anticomplémentaires, la majorité des laboratoires utilisent actuellement le complément à la concentration finale de 20 %.

III. PRÉVENTION DE LA SENSIBILISATION DES TRÉPONÈMES

in vivo, en vue de la préparation de la suspension antigénique de tréponèmes

Il a été prouvé [91] que le lapin est capable de produire l'anticorps immobilisant au tout début de l'infection tréponémique et dans le temps habituel de récolte des testicules en orchite, pour la préparation de l'antigène du T.P.I.

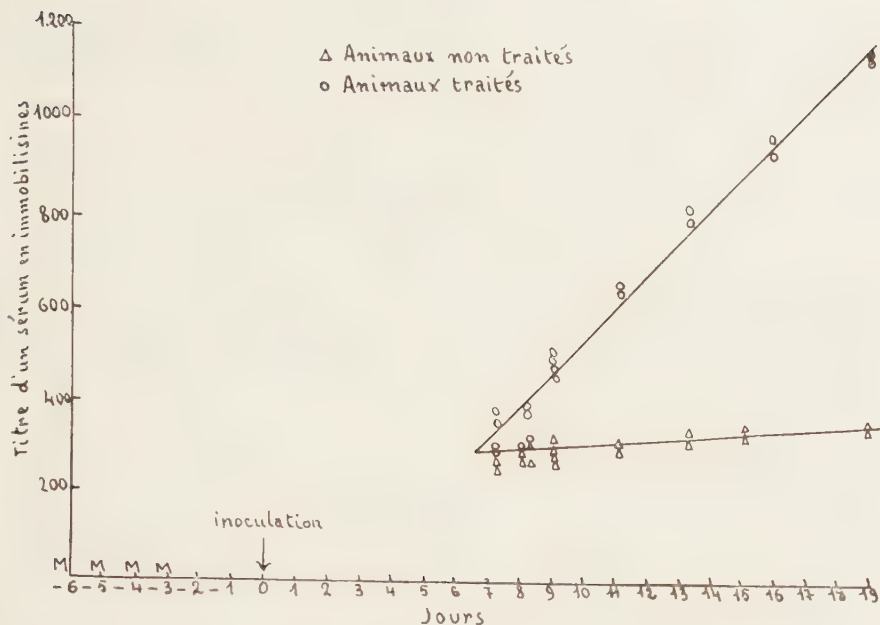
Dans la plupart des cas, la quantité d'anticorps étant très faible, elle n'intervient pas ou insensiblement dans le complexe antigène-anticorps de la réaction d'immobilisation. Cependant, l'aptitude à produire des anticorps est variable d'un animal à l'autre et il peut arriver que le taux d'anticorps, quoique non décelable par le témoin de série «complément actif + émulsion tréponémique», atteigne un degré subcritique, c'est-à-dire, qu'il suffit d'ajouter une quantité minime d'anticorps pour que l'immobilisation soit manifeste. On aura donc, avec des tréponèmes partiellement sensibilisés *in vivo*, des titres en immobilisines anormalement élevés. La sensibilité du test étant soumise à ce facteur variable, sa reproductibilité en subira les conséquences. Ce phénomène de sensibilisation est encore plus néfaste dans la pratique des tests quantitatifs qui risquent de perdre toute valeur.

C'est pour ces raisons que certains auteurs ont proposé diverses méthodes ayant pour but de remédier à la production précoce d'anticorps chez le lapin inoculé.

A. Emploi de la moutarde azotée (méthyl-bis-2-chloroéthylamine). Technique de Mayer et Seldeen [173].

Celle-ci est injectée par voie intraveineuse à la dose de 0,015 g par kilogramme de poids, pendant les 4 à 5 jours qui précéderont l'inoculation de tréponèmes. Seldeen a réalisé l'expérience suivante qui illustre le pouvoir inhibiteur de la moutarde azotée sur la production d'anticorps.

Un sérum positif connu est titré avec des suspensions de tréponèmes provenant de testicules de deux groupes de lapins infectés depuis 6 à 18 jours, le premier groupe étant soumis au traitement à la moutarde azotée et le deuxième, non traité. Les lapins des deux séries ont été infectés avec la même émulsion tréponémique et dans les mêmes conditions. La figure suivante montre que les taux d'anticorps des lapins non traités augmentent plus rapidement comparativement au lot traité.



B. Utilisation de la cortisone. Technique de Turner et Hollander [92].

La cortisone est injectée à la dose de 6 mg/kg à partir du 2^e ou 3^e jour après l'infection, quotidiennement jusqu'au jour du prélèvement des testicules. Le délai d'incubation du développement de l'orchite chez les animaux traités à la cortisone est un peu plus long, et varie entre 12 et 16 jours.

C. Irradiation par les rayons X.

Nelson [93] irradie les lapins 40 à 72 heures avant l'infection par deux champs latéraux de 300 r chacun, soit 600 r, pour tout le corps, en une seule fois. Les lapins irradiés ne donnent pas d'orchite précoce comme les témoins. Malgré cela, la pullulation des tréponèmes est deux fois plus grande pour les lapins irradiés après le même nombre de jours, comparativement aux lapins témoins qui, eux, présentent une orchite clinique.

Le contrôle de l'efficacité des rayons X se fait par le même titrage que celui indiqué pour la moutarde azotée.

DISCUSSION ET CONCLUSION : Ces traitements préalables des lapins ne sont cependant pas sans inconvénient. Un certain nombre d'animaux succombent à la suite de leur application en raison de l'abaissement de la résistance de l'organisme aux infections. Aussi n'est-il pas prudent d'utiliser, comme souche de passage, les tréponèmes provenant de ces animaux.

Pour notre part, nous n'avons jamais senti la nécessité d'appliquer ces méthodes de prévention de sensibilisation. Le protocole suivant

(tableau XXII), donné à titre d'exemple, montre les titres en immobilisines que nous avons obtenus, pour un même sérum de référence, à l'occasion de sept séries de tests de Nelson.

TABLEAU XXII

DATE DU T.P.I.	SÉRUM DE RÉFÉRENCE	TITRE EN IMMOBILISINES
16-9-57.....	N° III de l'O.M.S.	400 unités
18-9-57	—	310 —
23-9-57	—	270 —
25-9-57.....	—	285 —
4-12-57.....	—	270
9-12-57.....	—	355 —
12-12-57.....	—	320 —

Ces chiffres permettent de constater que, pour le même sérum, dans des essais échelonnés sur trois mois, les variations du titre en immobilisines sont très faibles (minimum 270 unités, maximum 400 unités) et très acceptables pour une réaction telle que le test de Nelson. Cette excellente reproductibilité dans nos résultats est peut-être due au fait que nous utilisons, dans chaque série de tests, plusieurs lapins-donneurs et qu'ainsi la suspension de tréponèmes est soumise à moins de variations individuelles.

En conclusion, la sensibilisation *in vivo* des tréponèmes peut être évitée en traitant les lapins soit par la moutarde azotée, soit par la cortisone, soit par irradiation aux rayons X. Cependant, la reproductibilité des tests peut être assurée également en utilisant plusieurs lapins-donneurs pour chaque série de tests, le mélange de plusieurs orchites jeunes permettant d'obtenir des antigènes d'une sensibilité pratiquement égale.

CHAPITRE III

LE TEST D'IMMOBILISATION DES TRÉPONÈMES EN SYPHILIS EXPÉRIMENTALE ET EN CLINIQUE HUMAINE

Nous allons aborder dans ce chapitre l'étude du test de Nelson chez les *animaux réceptifs à la syphilis*, son comportement sous l'action d'un traitement spécifique, et son application en clinique humaine.

I. LE T.P.I. CHEZ LES ANIMAUX RÉCEPTIFS A LA SYPHILIS

A. Lapins. — Dès les premiers essais du test de Nelson, en 1950, tous les chercheurs qui tentèrent de vérifier la valeur de cette méthode, l'ont appliquée aussi bien à des sérums humains, qu'à des sérums de lapins syphilités expérimentalement. Ce test s'est révélé constamment positif dans la syphilis expérimentale de cet animal ; la positivité apparaît après un délai d'environ 40 jours, atteint des taux élevés, le demeure après la cicatrisation des accidents spécifiques, et pratiquement pendant toute la durée de la vie du lapin.

B. Souris. — On sait que cet animal ne répond à la pénétration de *Treponema pallidum* que par une infection inapparente, avec une dispersion élective des spirochètes dans certains organes et principalement au niveau du revêtement cutané, sans aucune lésion anatomique. Cependant, le test d'immobilisation devient positif, mais après un délai plus long que pour l'animal qui répond par des lésions cliniquement décelables comme c'est le cas pour le lapin. Le délai minimum est de 100 à 120 jours après l'inoculation et le plus souvent le titre en anticorps reste peu élevé.

C. Rat. — Cet animal répond difficilement à l'infection tréponémique et le test s'est toujours révélé négatif dans nos essais.

D. Cobayes. — La syphilis se manifeste, chez le cobaye, dans la grande majorité des cas, par une infection inapparente, le développement des lésions cliniques au point d'inoculation n'étant que l'exception. Le test apparaît positif chez le cobaye vers le 150^e jour après l'infection et se maintient positif à un taux très élevé indéfiniment.

E. Hamsters. — Animal réceptif à la syphilis, mais ne présentant qu'une infection inapparente, comme la souris. Ici aussi, le test devient positif vers le 150^e jour et le demeure en permanence à un taux très élevé.

II. IMMOBILISINES ET CHIMIOTHÉRAPIE EN SYPHILIS EXPÉRIMENTALE

Nous avons réalisé toute une série d'essais consacrés à l'étude des variations du T.P.I. dans la syphilis expérimentale du lapin soumis à différents traitements.

A. Bismuthothérapie [14]. — La bismuthothérapie assure des effets se traduisant non seulement par une guérison clinique et microbiologique des plus nettes, mais encore par une négativation du test de Nelson. Lors d'une réinoculation d'épreuve, on a constaté que le bismuth, dans les conditions de nos essais, n'avait pas supprimé l'état d'immunité tissulaire locale. En dépit d'un tel état, la médication antérieure n'a exercé aucune influence ni sur la généralisation de l'infection dans le système ganglionnaire périphérique, ni sur l'accroissement progressif des valeurs du test de Nelson. Tout se passe donc comme si de telles inoculations-test avaient été effectuées à des sujets neufs, restés à l'abri de toute contamination spirochétienne antérieure.

En conclusion, un test de Nelson devenu négatif par suite d'un traitement bismuthique cliniquement et microbiologiquement effectif, appliqué à des lapins syphilités, indique l'existence d'une réceptivité parfaite du système lymphatique comparable à celle des sujets neufs, tout en étant compatible avec un état d'immunité tissulaire locale mis en évidence par les tests d'épreuve. D'où il semble résulter que les mécanismes qui régissent les deux ordres d'états réfractaires, tissulaire et profond, sont dissemblables et indépendants l'un de l'autre.

B. Pénicillinothérapie [16]. — Le traitement par la pénicilline-procaïne de la syphilis expérimentale provoquée chez le lapin par la souche tréponémique Nichols se révèle capable d'assurer la guérison radicale de l'infection, mis à part un certain degré d'immunité tissulaire. Ce traitement confère donc aux animaux des qualités réceptives semblables à celles des sujets normaux restés à l'abri de toute contamination spirochétienne. Le test de Nelson et Mayer est un fidèle miroir capable de refléter pour ainsi dire, à chaque instant, les diverses phases du processus thérapeutique pénicillinique, depuis l'évolution clinique et microbiologique des accidents et la stérilisation profonde de l'organisme, jusqu'à la récupération presque intégrale de la sensibilité à l'égard du tréponème. En dépit d'une faible immunité tissulaire, les sujets traités efficacement finissent donc par se comporter, à un moment donné, comme s'ils étaient des animaux neufs.

C. Association pénicilline-bismuth [18]. — Levaditi et Vaisman [94-96-97] ont, dès 1946, attiré l'attention sur l'action synergique de l'association pénicilline-bismuth dans le traitement de la syphilis expérimentale du lapin. De toutes les modalités de traitement, pénicilline seule, bismuth seul, ou les deux ensemble, c'est l'association du bismuth et de pénicilline-retard qui est la plus efficace. En effet, en dehors de la rapidité de disparition des tréponèmes et de la cicatrisation des lésions, la stérilisation du système lymphatique, de la rate, du sang et de la moelle osseuse est obtenue avec des doses de médicaments beaucoup plus faibles

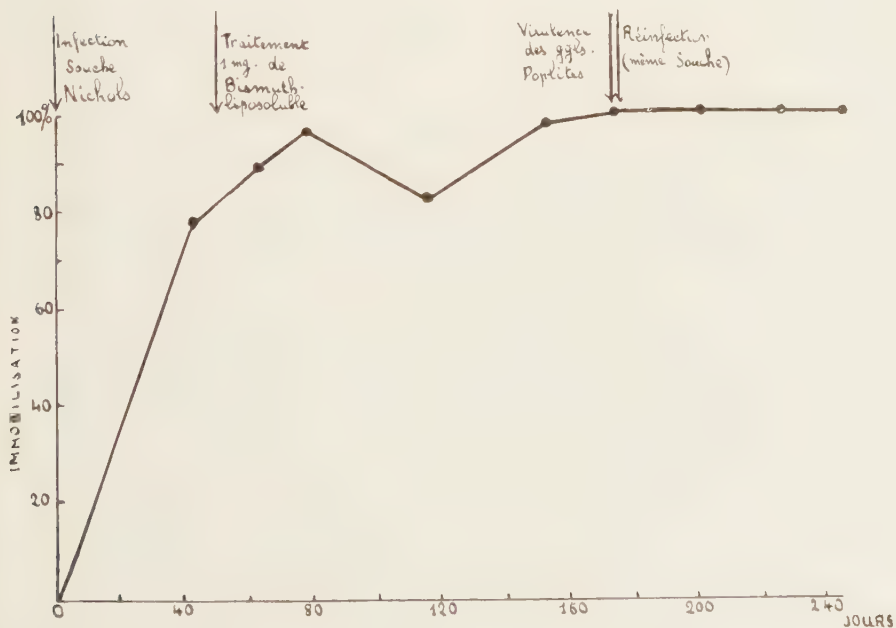
que si l'on emploie les deux agents antispirochéliens isolément (synergie de l'activité curative).

Il nous a semblé intéressant d'étudier les variations du taux des immobilisines sériques au cours du traitement par l'association pénicilline-bismuth dans les mêmes conditions expérimentales qui leur avaient permis d'établir la synergie de ces deux médications. »

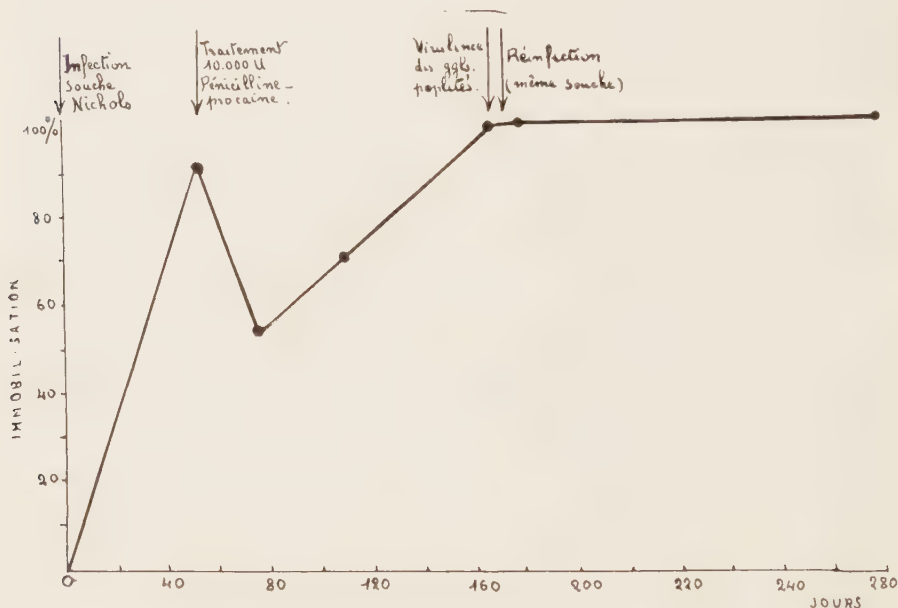
Trois lots de lapins ont été inoculés par voie sous-scrotale avec la souche tréponémique Nichols. 50 jours après l'inoculation spirochétienne, alors que les syphilomes testiculaires étaient en plein développement, un premier lot est traité par une seule injection intramusculaire de bismuth liposoluble à la dose subcurative de 1 mg par kilogramme, le deuxième lot reçoit une seule injection de pénicilline-procaïne à la dose de 10 000 unités par kilogramme, dose également subcurative, et le troisième est traité par les deux médicaments à la fois, soit 1 mg de bismuth liposoluble et 10 000 unités de pénicilline-procaïne par kilogramme, en une seule injection.

Des tests de Nelson sont pratiqués : le premier avant l'infection, le deuxième le 50^e jour, au moment du traitement, les suivants échelonnés environ tous les mois jusqu'à la fin de l'expérience.

1^o Il ressort de ces essais de traitements, qu'à la dose de 1 mg par kilogramme, le bismuth n'exerce pas une activité curative suffisante, puisque les ganglions restent virulents, la réinfection échoue et le taux des immobilisines augmente progressivement malgré le traitement, ainsi qu'en témoigne la courbe I représentant graphiquement la moyenne des résultats des T.P.I.



2° Parallèlement, une seule injection de 10 000 unités de pénicilline-procaïne provoque la disparition des tréponèmes et la cicatrisation assez rapide des lésions, mais ne produit pas une stérilisation profonde de l'animal. Les immobilisines, après une diminution du taux initial dans les quelques semaines qui suivent le traitement, remontent régulièrement, pour atteindre 100 %, comme pour des animaux non traités, ainsi que le montre la courbe II.



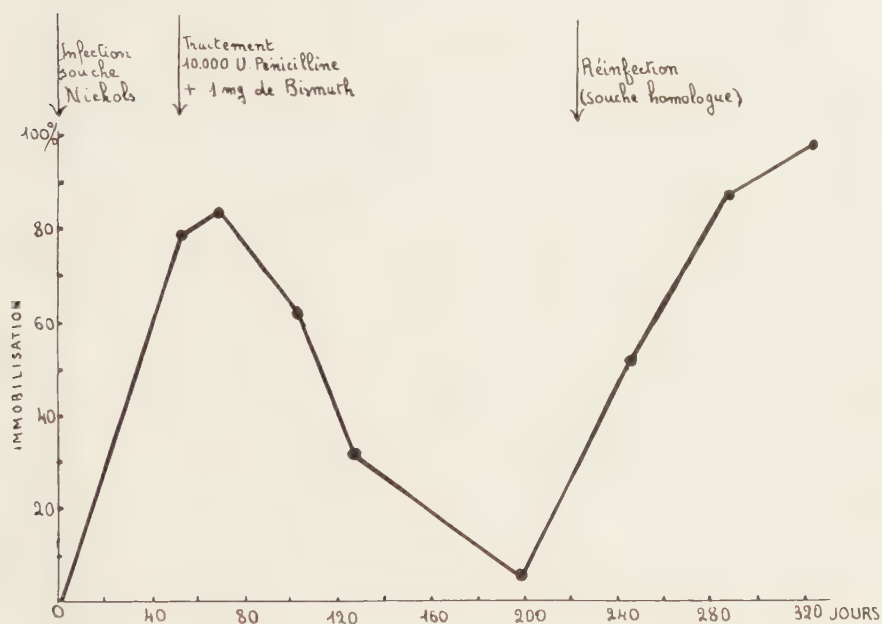
3° Contrairement à ce que nous avons observé pour les deux premières séries, le traitement par l'association pénicilline-bismuth détermine, non seulement la cicatrisation rapide des lésions et la stérilisation profonde ganglionnaire, mais, de plus, la disparition des immobilisines sériques, comme le prouve la négativation complète du test au 200^e jour, et l'épreuve positive de réinfection homologue, avec remontée en flèche du T.P.I.

Ainsi se trouve démontrée la supériorité de l'activité antisypilitique de l'association pénicilline-bismuth, dans la spécificité expérimentale du lapin que, ni la cure par des quantités équivalentes de bismuth-métal, ni celle par la pénicilline, n'ont été capables de réaliser chez tous les animaux en expérience, ce qui est prouvé, une fois de plus, par la négativation du test de Nelson.

En dehors de nos propres recherches que nous venons de résumer, nous nous devons de rapporter les importants travaux de Gastinel et Collard [95] sur l'interprétation du test de Nelson en syphilis expérimentale. Ils constatent que chez les lapins traités au maximum 100 jours après la syphilisation, le T.P.I. se négative dans 55 % des cas dans les 6 mois et dans le délai d'une année pour l'ensemble des animaux. Lorsque

le traitement est plus tardif, la chute des immobilisines s'effectue plus lentement. Après avoir obtenu la négativation durable du test, il suffit d'une injection de tréponèmes tués pour déclencher, dans la majorité des cas, une réapparition de la positivité du test qui joue le rôle d'une injection de rappel.

La courbe III résume les résultats obtenus avec l'association pénicilline-bismuth :



En conclusion, la syphilis expérimentale du lapin, de même que celle des animaux qui ne réagissent que par une infection inapparente (souris, cobaye et hamster) engendre l'apparition d'immobilisines sériques chez toutes ces espèces.

Chez le lapin, sous l'influence d'une thérapeutique efficace, on voit le taux des immobilisines diminuer progressivement jusqu'à leur disparition complète, ceci en accord avec les différentes preuves de stérilisation profonde de l'organisme (avirulence des ganglions lymphatiques, de la moelle osseuse, du sang et de la rate). Le test de Nelson est donc capable de refléter, pour ainsi dire à chaque instant, les diverses phases du processus thérapeutique, depuis l'évolution clinique et microbiologique des accidents jusqu'à la stérilisation totale de l'organisme.

Le test devenu négatif par suite du traitement spécifique, cliniquement et microbiologiquement effectif, indique l'existence d'une réceptivité parfaite du système lymphatique, comparable à celle de sujets neufs, tout en étant compatible avec un état d'immunité tissulaire

locale, rendu évident par des inoculations d'épreuve. Il semble donc que les mécanismes qui régissent les deux ordres d'états réfractaires, cutané et profond, soient dissemblables et indépendants l'un de l'autre.

III. ÉTUDE CLINIQUE

Ce chapitre sera davantage un résumé qu'une étude clinique détaillée, étude qui sortirait du cadre du présent travail.

Nous avons effectué [5-12-19-21-26] depuis octobre 1950 un total de 78 000 T.P.I. sur sérums ou liquides céphalo-rachidiens humains. Tous ces examens ont été faits parallèlement avec la sérologie lipidique classique, comportant quatre réactions : deux de fixation de complément (B.W. Demanche et B.W. Kolmer à la cardiolipine) et deux de flocculation (Kline et Kahn standard qualitatif et quantitatif).

Pour plus de clarté dans l'exposé des résultats obtenus, nous les avons classés suivant les différentes périodes de l'infection syphilitique et la régularité éventuelle du traitement.

A. Syphilis primo-secondaire.

Nous distinguerons, dans ce chapitre, deux catégories de malades : ceux traités en période présérologique et ceux traités après la positivité de la sérologie classique.

1^o SYPHILIS PRÉSÉROLOGIQUE. — Le test d'immobilisation pratiqué avant le traitement s'est toujours révélé négatif; mais, alors que la sérologie lipidique est restée constamment négative, la majorité des malades de ce groupe a présenté un crochet positif du test de Nelson qui survient, le plus souvent, après quelques mois, et peut persister jusqu'à un an à dix-huit mois, malgré les traitements les plus intenses et les plus efficaces.

2^o SYPHILIS PRIMO-SECONDAIRE A B.W. POSITIF AVANT LE TRAITEMENT. — Le plus fréquemment, le test vire vers la positivité avec un léger retard sur les réactions lipidiques. Mais, par contre, alors que ces dernières se négativent rapidement sous l'influence du traitement, le taux d'anticorps immunobilisant reste élevé, et peut même continuer à augmenter pendant plusieurs mois, pour décroître ensuite régulièrement, si le traitement a été correctement appliqué. Les contrôles ultérieurs, répartis sur plusieurs années ont montré le maintien de cette négativation, preuve de l'efficacité du traitement.

B. Syphilis tertiaire.

Dans tous les cas où le diagnostic de syphilis tertiaire a été cliniquement posé, que les réactions classiques soient fortement positives, douteuses, voire même négatives, le test s'est toujours révélé intensément positif et le demeure, quel que soit le traitement impliqué, ceci même dans les cas où la sérologie lipidique s'est négativée à la suite de la thérapeutique.

C. Syphilis nerveuse.

1^o PARALYSIE GÉNÉRALE.

Dans la paralysie générale, le test a toujours été trouvé positif dans le sang et dans le liquide céphalo-rachidien, le taux sanguin d'immobilisines étant plus élevé que celui du liquide. Chez tous les malades traités pour lesquels les épreuves classiques du sang et du liquide céphalo-rachidien sont revenues à la normale, et considérés le plus souvent comme cliniquement guéris, le T.P.I. est resté toujours positif, tout au moins dans le sang.

2^o TABÈS.

Dans les cas de tabès avérés, quelle que soit la sérologie classique du sang et du liquide céphalo-rachidien, le test de Nelson est toujours positif, et, comme dans la paralysie générale, souvent plus fortement dans le sang que dans le liquide, et restant non influencé par le traitement.

D. Syphilis congénitale.

Dans la syphilis congénitale, le T.P.I. est toujours positif, quelle que soit la sérologie classique. Le traitement, ici comme dans toute syphilis ancienne, tertiaire ou nerveuse, n'entraîne que peu ou pas de changements dans cette positivité. Nous devons faire remarquer, cependant, la possibilité de déceler la présence d'immobilisines chez les nouveau-nés issus de mère syphilitique, sans contamination proprement dite de l'enfant ; ces anticorps disparaissent progressivement en quelques mois, comme cela a lieu pour les réagines, simple transfert passif à travers le placenta, de la mère au rejeton. D'autre part, un nouveau-né, atteint de syphilis congénitale, peut présenter un test négatif à la naissance, test qui virera dans les mois suivants.

E. Syphilis sérologique asymptomatique.

Dans la grande majorité des cas, les réactions sérologiques classiques franchement positives et non dissociées concordent avec un T.P.I. positif, qui confirme l'existence réelle d'une spécificité asymptomatique. Si, dans certains cas, le traitement amène la négativation de la sérologie courante, il ne modifie en rien le taux d'immobilisation des tréponèmes.

F. Réactions faussement positives.

Un certain nombre de sérums fournissent des réactions positives en présence d'antigènes lipidiques, tout en se révélant dépourvus d'anticorps immobilisants. Les observations cliniques nous ont permis de constater qu'il s'agit principalement d'affections telles que : paludisme, cirrhoses, zona, leucémie, anémie hémolytique, pneumopathie aiguë, syndromes d'hépatosplénomégalie, psoriasis, tuberculose et hyperthyroïdie. Nous avons également relevé de telles fausses réactions positives chez des donneurs de sang, chez la femme en cours de grossesse et après vaccination antivariolique. Il s'agit, en général, de réactions faiblement

ou moyennement positives, le plus souvent dissociées et où les épreuves de floculation sont plus souvent en défaut que les hémolyses.

G. Syphilis insuffisamment ou irrégulièrement traitées.

Comme pour les sujets traités tardivement, les malades irrégulièrement ou insuffisamment traités en période primo-secondaire présentent toujours un test de Nelson positif, même si la reprise du traitement dure depuis de longues années.

H. Rechutes clinique et sérologique.

Qu'il s'agisse de rechutes cliniques accompagnées ou non d'une sérologie positive, ou bien d'une rechute sérologique seule, le test d'immobilisation fut toujours trouvé positif, restant inchangé, même après la reprise du traitement et, éventuellement, la nouvelle négativation de la sérologie.

I. B.W. irréductible.

Même persistance du T.P.I. positif également chez des anciens spécifiques intensément traités et dont le B.W. demeure irréductible.

J. Réinfection.

La réinfection déclenche très rapidement la formation d'anticorps immobilisants. La positivité du teste apparaît donc beaucoup plus précocement qu'après la première infection, voire même avant la sérologie classique. Nos travaux de syphilis expérimentale chez le lapin, nous avaient permis de faire les mêmes observations et ce peut être là un moyen de distinguer la réinfection de la rechute.

CONCLUSION

Notre expérience du test de Nelson nous permet d'apporter les conclusions suivantes quant à son application clinique :

Le test de Nelson est plus sensible que les réactions sérologiques courantes, et sa positivité persiste plus longtemps; il peut d'ailleurs demeurer le seul test positif alors que le séro-diagnostic lipidique est devenu négatif. Signalons toutefois que, dans la syphilis primaire, l'apparition des immobilisines est plus tardive que celle des réagines.

La diminution du taux des immobilisines plaide en faveur d'une évolution de la maladie vers la guérison. Le test de Nelson est, de ce fait, la mesure la plus sensible au point de vue du contrôle des effets du traitement et pourrait, dans certaines conditions, constituer un indice de guérison. La persistance d'un test positif, chez un syphilitique récent, et à plus forte raison, une reprise de la positivité suggèrent l'idée que la maladie n'a pas été jugulée et qu'il y a lieu de reprendre un traitement plus énergique.

Cependant, dans les syphilis anciennes, la persistance des anticorps immobilisants (coïncidant ou non avec un Bordet-Wassermann irré-

ductible) ne signifie pas, d'une manière absolue, la coexistence d'une tréponémose en activité. Il y a lieu d'admettre, en effet, qu'à l'exemple de ce qui se passe dans d'autres maladies infectieuses, l'organisme peut continuer à élaborer des immobilisines après l'épuisement du facteur antigénique.

Par ailleurs, il est démontré que certains états morbides autres que la syphilis, confèrent aux sérums des propriétés nouvelles se traduisant par des réactions classiques *faussement positives*. La présence ou l'absence des immobilisines tranche le problème et permet d'affirmer si une réaction est ou non *fausse*.

En résumé, le test de Nelson se révèle d'une *spécificité rigoureuse* et d'une *sensibilité* très supérieure à celle des réactions classiques, et de ce fait, il peut être considéré comme le meilleur élément que le laboratoire peut apporter au clinicien, pour éclairer les problèmes si complexes que pose, dans certains cas, l'infection syphilitique.

Toutefois, étant donné les difficultés techniques de l'exécution de ce test, celui-ci doit rester, jusqu'à la mise en application de méthodes plus simples, dans le domaine des laboratoires spécialisés.

DEUXIÈME PARTIE

LES AUTRES RÉACTIONS UTILISANT DES ANTIGÈNES TRÉPONÉMIQUES

La sérologie de la syphilis, depuis l'application par Wassermann, en 1906, du principe de la réaction de Bordet-Gengou, au sero-diagnostic de cette infection, est sans cesse l'objet de perfectionnements. Malgré les nouvelles méthodes employant les antigènes à base de cardiolipine, cette sérologie lipidique est encore souvent en défaut, soit par manque de sensibilité, soit — ce qui est encore plus grave — par sa non-spécificité. Ces réactions à antigènes lipidiques sont loin d'atteindre la rigoureuse spécificité du test d'immobilisation des tréponèmes, réalisée en 1949 par Nelson et Mayer et que nous venons d'exposer. Cette méthode, dont l'antigène est le tréponème pâle, vivant, lui-même, a résolu le problème de la spécificité du sero-diagnostic, mais sa réalisation reste délicate et difficilement praticable pour la majorité des laboratoires. Pour cette dernière raison, de nombreux auteurs sont à la recherche de techniques plus simples, qui se rapprocheraient davantage du test de Nelson que de la sérologie lipidique.

Les principales techniques sérologiques actuelles utilisant les antigènes tréponémiques en dehors du test d'immobilisation, sont les suivantes :

- la réaction d'adhérence-disparition (immune-adhérence),
- les réactions d'agglutination,
- les réactions d'hémolyse avec antigène *Reiter* de culture et *T. pallidum* pathogène.

Seront également exposés, les tests cutanés utilisant les antigènes tréponémiques, comme autre moyen de diagnostic de la syphilis.

CHAPITRE IV

LA RÉACTION D'ADHÉRENCE DISPARITION DES TRÉPONÈMES (T.P.I.A.)

De même que le test d'immobilisation, nous devons cette réaction à Nelson [98-99]. C'est en étudiant la phagocytose des tréponèmes *in vitro* qu'il aboutit à cette nouvelle technique qui consiste en un attachement des tréponèmes sensibilisés par l'anticorps spécifique, sur des hématies humaines.

I. PRINCIPE DE LA RÉACTION

Dès 1950, Nelson réalisa les premières expériences ; il mit en contact une suspension de tréponèmes tués par la chaleur avec un sérum syphilitique, ce mélange étant mis en présence de sang total frais hépariné d'un sujet humain normal. Après un séjour à l'étuve à 37 °C, il observa la disparition d'un grand nombre de tréponèmes, alors qu'avec un mélange fait avec du sérum normal, il n'y avait aucune diminution du nombre de spirochètes. Cette expérience montrait l'existence d'un anticorps spécifique produisant le *phénomène de disparition des tréponèmes*, en présence de complément fourni par le sang total hépariné frais.

Ces premières recherches pouvaient faire penser qu'en présence de complément, les leucocytes phagocytèrent les parasites sensibilisés par l'anticorps.

Cependant, en étudiant les principaux facteurs de cette réaction, Nelson aboutit à une constatation fort surprenante et intéressante, à savoir l'intervention des hématies dans le mécanisme de la disparition des tréponèmes.

Il prépara trois suspensions : une d'hématies dans du plasma frais, une autre de leucocytes et une troisième correspondant aux éléments du sang total. Ces suspensions différentes mises en présence de sérum spécifique et de tréponèmes sont placées à l'étuve à 37 °C, pendant une heure, puis centrifugées à 1 500 t/mn pendant 5 minutes. On prélève le liquide surnageant dont une goutte calibrée est examinée à l'ultra-

microscope, pour déterminer le nombre de tréponèmes dans 20 champs. Le culot de centrifugation est ramené au volume primitif avec du sérum isotonique et examiné de la même façon. Les résultats sont consignés dans le tableau XXIII :

TABLEAU XXIII

CELLULES	NOMBRE D'HÉMATIES PAR MM ³	NOMBRE DE LEUCO- CYTES PAR MM ³	NOMBRE DE TRÉPONÈMES PAR 20 CHAMPS	
			liquide surnageant	culot de centri- fugation
a) sang total.....	5 020 000	3 940	0	3,5
b) hématies dans plasma...	4 000 000	60	1	27
c) leucocytes dans plasma..	8 000	8 500	31	—
d) plasma pur sans cellules.	0	0	40	—

Il résulte de ce tableau que :

- En présence de *sang total*, les tréponèmes disparaissent du liquide surnageant et le culot de centrifugation en contient très peu, la majorité ayant été phagocytée.
Mais en examinant le rôle de chacun des éléments du sang, on constate que :
- En présence d'*hématies seulement*, les tréponèmes disparaissent du liquide surnageant, mais se retrouvent en presque totalité dans le culot de centrifugation, adhérents aux globules rouges ;
- Les *leucocytes seuls* n'ont aucune action dans le phénomène de disparition puisque tous les tréponèmes restent dans le liquide surnageant ;
- De même, le *plasma*, sans éléments figurés, n'intervient pas non plus dans ce phénomène.

Ainsi fut démontré le rôle des hématies dans le mécanisme de l'adhérence-disparition des spirochètes. En effet, dans les préparations avec seulement des hématies, les tréponèmes adhèrent à celles-ci soit par un point seulement, soit par l'une des extrémités du parasite, soit par une portion d'une spire ; parfois même le corps entier du tréponème est enroulé autour du globule. Il est à signaler que seules les hématies humaines conviennent [100], et que tous les essais pratiqués avec des globules rouges de différentes espèces animales ont donné des résultats non satisfaisants.

Pour Nelson, la phagocytose des tréponèmes suivrait les étapes successives énumérées dans le tableau XXIV :

TABLEAU XXIV

ÉTAPES THÉORIQUES DE LA RÉACTION OBSERVÉE, *in vitro*, ENTRE *T. pallidum* (T.P.) L'ANTICORPS (Ac), LE COMPLÉMENT (C') ET LES CELLULES (Gl.R. et Gl. B) DU SANG HUMAIN NORMAL.

1. TP + Ac $\longrightarrow$ TP — Ac *Sensibilisation.*
2. TP — Ac + C' $\longrightarrow$ (TP — Ac) — C' .. *Fixation du complément.*
3. (TP — Ac) — C'
+ Gl.R $\longrightarrow$ [(TP — Ac) — C' — Gl.R] .. *Phénomène de l'adhérence.*
 - a) Cette adhérence ne survient pas avec les plaquettes ou les leucocytes.
 - b) Elle survient même avec hématies lysées.
4. [(TP — Ac) — C' — Gl.R]
+ Gl.B $\longrightarrow$ Disparition totale *Phénomène de la disparition.*
Probablement phagocytose.

C'est la première fois que fut démontrée l'intervention des hématies dans le phénomène de la phagocytose. Et ceci est valable non seulement pour les tréponèmes, mais pour un certain nombre d'autres germes [101]. Nelson et Robineaux [102] ont suivi par enregistrement microcinématographique les phases de la réaction et il apparaît très nettement que les phagocytes s'emparent des germes qui adhèrent aux hématies et les englobent sans toucher à ces dernières.

II. TECHNIQUE DE LA RÉACTION

Nous allons décrire la technique récemment donnée par Rein et Kelcec [103], qui a été vérifiée sur environ 4 000 sérums avec des résultats très satisfaisants.

A. Préparation des réactifs.

1° SÉRUM A EXAMINER.

Le sang du malade, prélevé à jeun, est centrifugé après coagulation et le sérum décanté est inactivé par chauffage à 56 °C pendant 30 minutes.

Il est ensuite soumis à une absorption par l'antigène V.D.R.L. pour éliminer les réagines. On procède de la manière suivante : 1 ml d'antigène V.D.R.L. est précipité par 5 ml d'eau physiologique, en ajoutant le premier centimètre cube d'eau goutte à goutte. Après centrifugation à 3 000 t/mm pendant 20 à 30 minutes, le liquide surnageant est décanté, et le culot remis en suspension dans 5 ml d'eau physiologique. Après une nouvelle centrifugation identique, le liquide surnageant est rejeté et on ajoute sur le culot de lipides 1 ml du sérum du malade inactivé. On laisse sérum et antigène homogénéisés en contact au bain-marie à 37 °C pendant une heure, puis au frigidaire à - 4 °C pendant une nuit. Le mélange est alors filtré sur une membrane micro-Seitz pour éliminer les particules lipidiques d'antigène.

2° SUSPENSION DE TRÉPONÈMES-ANTIGÈNE.

Les tréponèmes sont extraits d'une orchite de lapins, puis lavés, pour éliminer tous débris tissulaires et hématies. La suspension est diluée de manière à obtenir une concentration de 10 à 15 tréponèmes par champ d'ultramicroscope et du phénol est ajouté à raison de 0.25 g %. Cet antigène est de très bonne conservation, à + 4 °C pouvant être gardé dans ces conditions jusqu'à une année.

3° SOLUTION DE HANKS.

Solution isotonique tamponnée de formule suivante :

NaCl	8,00 g
KCl.....	0,40 —
CaCl ₂ anhydre	0,14 —
MgSO ₄ , 7 OH ₂	0,20 —
Na ₂ HPO ₄ , 2 OH ₂	0,06 —
KH ₂ PO ₄	0,06 —
NaHCO ₃	0,35 —
Glucose.....	1,00 —
Rouge de phénol	0,02 —
Eau distillée.....	q.s.p. 1 000 ml

4° HÉMATIES HUMAINES.

Prélever du sang humain d'un donneur sain du groupe O sur solution anticoagulante, citrate-dextrose par exemple.

Préparer, d'autre part, une solution mère de gélatine à 3 % dans l'eau physiologique; répartir cette solution en tube à essais, sous le volume de 7 ml et autoclaver. Les tubes sont conservés au frigidaire. Au moment de la réaction, faire fondre un tube de gélatine, en prélever 5 ml que l'on mélange à 95 ml d'eau physiologique. On obtient ainsi une solution isotonique à 0.15 % de gélatine. Laver le sang humain quatre fois avec cette solution isotonique gélatinée. Après le dernier lavage, les hématies sont remises en suspension dans un volume égal de la même solution pour constituer une dilution à 50 %.

5° COMPLÉMENT.

Rein et Kelcec utilisent le sérum du même donneur qui a fourni les hématies du groupe O. Ce sérum est conservé en volumes fractionnés, à — 20 °C, jusqu'au moment de la réaction.

On peut également utiliser le complément de cobaye.

B. Réaction proprement dite.

a) Elle comporte deux tubes par sérum à examiner :

	Tube réaction ml	Tube témoin ml
Suspension de tréponèmes	0,5	0,5
Sérum à examiner absorbé avec l'antigène V.D.R.L.	0,1	0,1
Sérum syphilitique connu, inactivé	—	0,1
Solution de Hanks	0,2	0,1
Bain-marie à 37 °C pendant 30 minutes.		
Complément humain	0,1	0,1
Hématies humaines (suspension à 50 %)	0,1	0,1

Bain-marie à 37 °C pendant 30 minutes (agiter doucement les tubes à trois reprises au cours de ces 30 minutes).

b) Préparer, d'autre part, les témoins de série suivants :

	T I	T II	T III	T IV
	—	—	—	—
	ml	ml	ml	ml
Suspension de tréponèmes	0,5	0,5	0,5	0,5
Sérum syphilitique connu, inactivé.....	—	0,1	—	0,1
Solution de Hanks	0,5	0,3	0,3	0,2
Bain-marie à 37 °C pendant 30 minutes.				
Complément humain	—	0,1	0,1	0,1
Hématies humaines (suspension à 50 %)	—	—	0,1	0,1

Bain-marie à 37 °C pendant 30 minutes (agiter doucement les tubes à trois reprises au cours de ces 30 minutes).

Après ce deuxième passage au bain-marie tous les tubes sont centrifugés pendant 5 minutes à 500 t/mn, vitesse maxima. Le liquide surnageant est alors séparé du culot d'hématies par décantation.

C. Lecture.

Avec une pipette de 0,01 ml graduée au 1/1000, prélever 0,005 ml du liquide surnageant de chaque réaction, et placer ce volume exactement mesuré entre lame et lamelle sans bulles d'air. Compter à l'ultramicroscope le nombre de tréponèmes dans 20 champs (objectif à sec, oculaires 12,5 ×).

1° LECTURE DES TÉMOINS DE SÉRIE.

T I = témoin antigène (pas de disparition, ni agglutination).

T II = une certaine disparition des tréponèmes, comparativement à T I, indique qu'il y a eu agglutination des organismes.

T III = une diminution du nombre de tréponèmes, comparativement à T II indique que probablement les tréponèmes ont été sensibilisés par la présence d'anticorps dans le sérum du lapin qui a servi de source pour leur extraction.

T IV = tous les éléments de la réaction étant présents avec un sérum positif connu, ce tube doit présenter une disparition quasi-totale des tréponèmes. Dans le cas contraire, on peut supposer soit que le sérum utilisé n'est pas positif, soit que le complément est insuffisamment actif.

2° LECTURE DES TUBES DE LA RÉACTION PROPREMENT DITE.

Tube témoin. — Le témoin fait pour chaque sérum à examiner doit présenter le même degré de disparition des tréponèmes que le témoin de série T IV, puisqu'il contient du sérum syphilitique connu en plus du sérum à examiner. Dans le cas contraire, le sérum à tester aura empêché cette disparition par une action anticomplémentaire et dans ce cas, la réaction ne sera pas valable et le test sera considéré comme « non-interprétable ».

Tube réaction. — Après avoir compté le nombre T de tréponèmes dans 20 champs, le pourcentage de disparition spécifique (S.D.) est calculé selon la formule suivante :

$$\text{S.D. \%} = \frac{\text{Ag} - \text{T}}{\text{Ag}} \times 100$$

ou Ag représente le nombre de tréponèmes dans 20 champs du tube témoin de série T III.

III. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

S.D.	0 à 25 %	— réaction négative.
S.D.	26 à 50 %	= réaction faiblement positive.
S.D.	51 à 75 %	= réaction moyennement positive.
S.D.	76 à 100 %	= réaction fortement positive.

Nous avons exposé en détail la technique de Rein et Kelcec, car il semble que ces auteurs qui ont examiné plus de 4 000 sérums aient la plus grande expérience de ce test. Un certain nombre de modifications ont été proposées. Daguet [104] donne plusieurs variantes possibles. Il pratique soit une *réaction directe* avec le sang total du malade (apportant hématies, complément et éventuellement l'anticorps) en prévoyant pour chaque sérum un tube témoin avec sérum positif connu qui sert à vérifier la réactivité des cellules sanguines et du complément du malade en présence d'anticorps, soit une *réaction indirecte*, avec 4 modalités différentes pour lesquelles les hématies et le complément proviennent d'un donneur sain de groupe O. De plus, il n'élimine pas les réagines avant la réaction d'adhérence-disparition.

Quelle que soit la technique utilisée, la réaction présente, cependant, plusieurs points délicats qui font la difficulté de ce test. L'élimination des réagines des sérums est déjà un procédé long et coûteux. On a constaté également des différences notables entre les lots d'antigènes, dont certains sont pratiquement inutilisables, bien que préparés dans les mêmes conditions. Mais la plus grosse des difficultés tient à la lecture, en raison du faible volume à introduire entre lame et lamelle, et de l'inégale distribution des tréponèmes. On peut avoir ainsi des variations du simple au double dans la détermination du nombre de tréponèmes disparus.

IV. TEST D'HÉMAGGLUTINATION

Un autre mode d'observation de la fixation des tréponèmes aux erythrocytes a été suggéré par Nelson et étudié par Daguet [105], méthode qui permettrait de remédier aux grosses difficultés dans la détermination précise du nombre des spirochètes disparus dans le T.P.I.A. Il s'agit d'une technique d'hémagglutination pour laquelle on utilise les mêmes réactifs que pour le T.P.I.A. et qui se pratique de la manière suivante :

Antigène.....	1 ml
Complément.....	0,05 ml
Sérum suspect dilué au 1/3.....	0,10 ml
Bain-marie à 37 °C pendant 15 minutes.	
Hématies humaines diluées à 2 %.....	0,10 ml
Bain-marie à 37 °C pendant 10 minutes.	
Agitation légère.	
Repos pendant 1 à 2 heures à 37 °C ou température ambiante.	

La lecture se fait par examen de la forme du sédiment :

réaction négative Pas d'agglutination. - Petits disques d'hématies à bords bien réguliers.
réaction positive = Culot granuleux d'hématies à bords crénelés ; l'agglutination plus ou moins intense est notée de + à ++++ selon la taille du dépôt.

Les premiers résultats obtenus par Daguet avec cette hémagglutination concordent avec ceux du T.P.I.A.

Conclusion

Le T.P.I.A. offre certains avantages :

- a) Emploi d'un antigène qui est le tréponème tué donc conservable ;
- b) Réaction rapidement exécutée et ne nécessitant pas des précautions de stérilité comme l'exige le T.P.I. ;
- c) Réaction dont les résultats semblent être aussi spécifiques que ceux du T.P.I., mais pour laquelle les recherches ont montré qu'il s'agissait d'un anticorps différent de l'immobilisine ; de ce fait, on ne peut la substituer au test de Nelson avant une investigation plus large.

Ses deux inconvénients majeurs sont :

- a) Les variations des lots d'antigènes, pas toujours explicables ;
- b) La difficulté de dénombrement précis des tréponèmes disparus à la lecture.

CHAPITRE V

LES RÉACTIONS D'AGGLUTINATION DES TRÉPONÈMES

I. PRINCIPE

Ces réactions consistent à mettre en contact le sérum à examiner avec une suspension de tréponèmes vivants ou tués, et à apprécier par l'ultra-microscope le degré d'agglutination des spirochètes.

II. HISTORIQUE

La simplicité du principe de cette technique avait incité, dès la découverte du tréponème, nombre d'auteurs à essayer de la mettre en œuvre pour le séro-diagnostic de la syphilis. Parmi les premiers, on peut citer Hoffmann (1906) [106], Levy-Bing [43], Levaditi et Marie (1907) [44], mais il faut surtout mentionner l'important travail de Touraine (1912) [45], qui y consacra sa thèse. Celui-ci décrivait une agglutination stellaire des tréponèmes par les sérums spécifiques. De plus, constatant que les tréponèmes perdaient leur mobilité et subissaient la dégénérescence granuleuse sous l'action des anticorps de ces sérums, il arriva à la conclusion de l'existence d'une action bactéricide sur le germe pathogène. On peut encore citer les essais de Zabolotny et Maslakowetz [107], ceux d'Ebersson, Tani et Ogiuti, et Turner.

III. TECHNIQUES ACTUELLES

Ces dernières années, plusieurs techniques furent proposées. Elles diffèrent entre elles par le traitement des lapins source de tréponèmes, le liquide d'extraction et la méthode d'inactivation des parasites, l'agent conservateur, le volume des réactifs, la concentration maxima du sérum et la durée de la période d'incubation de la réaction.

Quatre sont à retenir, dont voici les principales caractéristiques :

A. Technique d'agglutination de Tani [108].

Utilisant des tréponèmes pathogènes de diverses souches japonaises, Tani préparait une suspension de spirochètes en eau physiologique à partir d'orchite de lapins infectés expérimentalement. Pour remédier à l'agglutination spontanée de ces parasites, inconvénient fréquent qui survient surtout au cours de la conservation de la préparation, Tani traite les tréponèmes par 0,5 à 0,7 % d'antiformine pendant 30 minutes, puis les reprend par l'eau physiologique phénolée à 0,5 %. Sa réaction consiste à mettre en présence 0.1 ml de cet antigène avec 0.1 ml de sérum dilué au 1/10 dans l'eau physiologique phénolée à 0,5 %. Après 3 à 24 heures d'incubation à 37 °C, la lecture est faite en appréciant entre lame et lamelle, à l'ultramicroscope, le degré d'agglutination des parasites.

Il constate que les tréponèmes s'agglutinent en présence de sérums de lapins syphilités ou de malades atteints de spécificité, tandis que les sérums de lapins normaux ou infectés avec des trypanosomes ou des spirochètes du Sodoku, ainsi que les sérums humains normaux n'exercent aucun pouvoir agglutinant sur ces émulsions. Les injections intraveineuses d'émulsions de tréponèmes traités par l'antiformine provoquent la formation d'agglutinines spécifiques chez le lapin. Diverses souches de « *Spirocheta pallida* » se sont montrées immunologiquement identiques par cette technique. Par contre, il lui a été possible de différencier le *Treponema pallidum* du *Treponema pertenue* par une technique d'adsorption spécifique. Les premiers résultats obtenus lui paraissaient satisfaisants, mais avec un plus grand recul, Tani [109] constata qu'environ 25 % des sérums normaux donnaient une agglutination non spécifique, agglutination plus faible cependant que celle présentée par la majorité des sérums provenant de spécificités.

B. Technique de Cain [110].

Celui-ci prépare avec du milieu de survie de Nelson son antigène en extrayant les tréponèmes d'orchite précoce de lapins traités au préalable par les rayons X (600 r). Les spirochètes sont chauffés à 56 °C pendant 30 minutes et l'émulsion est conservée à + 4 °C. La réaction proprement dite consiste à mettre en présence 0,5 ml d'antigène avec 0,5 ml de sérum suspect, et la lecture est effectuée après 6 à 24 heures d'incubation à 37 °C. Les résultats obtenus par l'auteur sont sensiblement comparables à ceux du T.P.I. mais le nombre des examens pratiqués est relativement faible.

C. Technique de McLeod et Magnuson [111].

L'antigène est une suspension de tréponèmes (souche Nichols) dans l'eau physiologique, provenant d'orchite de lapins inoculés depuis 7 à 10 jours et n'ayant subi aucune préparation spéciale. Cette suspension est ajustée à la concentration de 60 à 75 spirochètes par champ d'ultra-

microscope. Dans le but d'assurer une bonne dispersion des organismes, les auteurs ajoutent de l'albumine bovine, fraction V, afin d'obtenir une concentration finale de 5 %. L'émulsion est alors chauffée à 56 °C pendant 40 minutes, et conservée ensuite à + 4 °C. Gardé dans ces conditions, l'antigène ne présente aucune agglutination spontanée pendant au moins 3 mois de conservation.

La technique de McLeod comporte dans un premier temps, une pré-sensibilisation, c'est-à-dire une mise en contact de l'antigène (0,1 ml) avec le sérum suspect inactivé (0,1 ml) qui sont agités pendant 2 à 23 heures. Tous les sérums sont faits en double, et, après cette sensibilisation, il ajoute dans un des tubes 0,1 ml de sérum de bouvillon dilué (1/7 à 1/15) et dans le second, le même volume d'eau physiologique. Les tubes sont de nouveau agités pendant 10 minutes sur un agitateur Kahn puis incubés pendant 2 heures soit à la température du laboratoire, soit à 35 °C.

Le rôle joué par le sérum de bouvillon [112] ajouté à la réaction est de renforcer l'agglutination des tréponèmes en présence d'anticorps par l'apport d'une congulinine. La dilution à laquelle il doit être utilisé, variable entre 1/7 et 1/15, doit être choisie de manière à ce qu'elle n'entraîne pas à elle seule l'agglutination de l'antigène.

Les résultats donnés par cette méthode sont satisfaisants quant à la sensibilité, voisine de celle du T.P.I., mais sa spécificité est moins rigoureuse.

D. Technique de Hardy et Nell.

La technique de Hardy et Nell [113] se différencie des précédentes par le mode de préparation de l'antigène et par l'utilisation dans la réaction elle-même d'un agent chélateur, l'acide éthylène-diaminotétracétique (E.D.T.A.). Les tréponèmes proviennent de lapins infectés avec la souche Nichols et traités par la cortisone dès le 2^e jour après l'inoculation jusqu'à l'apparition de l'orchite. Celle-ci est un peu plus tardive et se manifeste entre le 12^e et 16^e jour, comparativement à des lapins non traités. L'extraction se fait avec une solution de citrate de sodium à 0,075 M. Après une première centrifugation légère pour éliminer les débris cellulaires, la suspension de tréponèmes est soumise à une nouvelle centrifugation de 35 000 t/mn pendant 30 minutes. Le culot de spirochètes est repris par de l'eau physiologique pour obtenir une concentration de 10⁸ tréponèmes par millilitre, et inactivé par chauffage de 2 heures à 65 °C.

Pour la conservation de cet antigène, Hardy ajoute 0,01 % de merthiolate et une solution tampon phosphatée à 0,1 M, à raison de 1/20 du volume, le pH obtenu étant 7,6 environ.

La réaction se pratique en mélangeant 0,1 ml d'antigène à 0,1 ml de sérum inactivé et dilué au 1/10 dans de l'eau physiologique contenant 0,005 M d'E.D.T.A., ajustée à pH 7,6.

La lecture est faite après une incubation de 18 heures à 37 °C.

Les essais de Hardy ont porté sur 430 sérums humains, comparativement au T.P.I. et à la sérologie lipidique. Les résultats de l'agglutination se révèlent comparables en spécificité au T.P.I., à condition d'éliminer au préalable les réagines du sérum.

TABLEAU XXV

TABLEAU COMPARATIF DES DIVERSES TECHNIQUES D'AGGLUTINATION

AUTEURS	TANI	CAIN	McLEOD	HARDY
Souche de <i>T. pallidum</i>	Diverses souches japonaises	Nichols	Nichols	Nichols
Traitement des lapins	aucun	Rayons X (600 r)	aucun	cortisone
Extraction des tréponèmes après l'inoculation	3 ^e et 4 ^e semaine	orchite précoce	8 ^e à 10 ^e jour	12 ^e à 16 ^e jour
Liquide d'extraction	eau physiologique	milieu de base de Nelson	eau physiologique	citrate de sodium
Méthode d'inactivation	0,5 à 0,7 % d'antiformine	chauffage à 56 °C pendant 30 minutes	chauffage à 56 °C pendant 40 minutes	chauffage à 65 °C pendant 120 minutes, parfois, réchauffage à 100 °C pendant 60 minutes
Agent préservateur	0,5 % de phénol	aucun; conservation à + 2 à 4 °C	aucun; conservation à + 4 °C	merthiolate à 0,01 %
Volume des réactifs dans le test : Sérum	0,01 ml (0,1 ml d'une dilution à 1/10)	0,5 ml	0,1 ml	0,01 ml (0,1 ml d'une dilution à 1/10)
antigène	0,1 ml	0,5 ml	0,1 ml	0,1 ml
autres réactifs	dilution du sérum dans l'eau physiologique phénolée à 0,5 %		0,1 ml d'une dilution à 1:7 à 1:15 de sérum de bouvillon dans NaCl M/7	sérum dilué dans une solution de EDTA à 0,005 M dans NaCl M/7
Concentration maxima du sérum...	1:20	1:2	1:3	1:20
Temps d'incubation	3-24 h à 37 °C	6-24 h à 37 °C	2-23 h à 37 °C	18 h à 37 °C

Le tableau XXV résume les quatre principales techniques d'agglutination que nous venons de décrire [114].

DISCUSSION

Comme nous venons de le voir, les réactions d'agglutination des tréponèmes apparaissent très simples dans leur principe; elles sont cependant très délicates en pratique. Leurs inconvénients majeurs résident principalement dans :

- la difficulté de la lecture,
- la préparation des antigènes qui sont souvent inconstants,
- la nécessité d'éliminer les réagines des sérums, celles-ci pouvant donner lieu à des agglutinations non spécifiques.

a) Quelle que soit la technique envisagée, le mode de lecture reste le même et consiste à déterminer, avec l'ultramicroscope, le degré d'agglutination des tréponèmes. Mais cette lecture n'est pas sans difficulté. En effet, Cain et McLeod ont constaté que, pour certains sérums à très forte action agglutinante, les tréponèmes pouvaient être agglutinés en amas tellement gros que la plupart des champs d'ultramicroscope semblaient dépourvus de tout spirochète. La rareté de ces gros amas pouvait même faire croire à une lyse des organismes. Cette remarque a conduit à établir la lecture, non seulement sur la grosseur des amas, mais encore sur la quantité d'organismes libres dans le champ. La technique décrite par Hardy n'est pas aussi sujette à cette disparition totale des organismes avec les sérums fortement agglutinants et la lecture n'est basée ici que sur la grosseur des amas seulement. Cependant, bien qu'il soit facile de différencier un sérum fortement positif d'un autre franchement négatif, la zone intermédiaire de positivité est considérablement étendue et difficile à interpréter. Ceci est particulièrement évident quand on essaie de faire des tests quantitatifs. La dilution finale, limite d'agglutination, est alors difficile à déterminer et il en résulte des différences de lecture très importantes selon l'opérateur par exemple. Cet inconvénient n'est d'ailleurs pas spécial à l'agglutination des tréponèmes pathogènes, mais est commun à tous les tests d'agglutination, et il semble que ce soit un obstacle, sinon très grave, du moins difficile à surmonter.

b) La préparation des antigènes est également un point délicat comme le montre la difficulté d'obtention de suspensions antigéniques satisfaisantes. A l'heure actuelle, il ne semble pas possible d'attribuer ces difficultés au non-traitement ou traitement éventuel des lapins par les rayons X ou la cortisone. Il est difficile aussi de mettre sur le compte de l'âge de l'orchite au moment de la récolte des tréponèmes, la mauvaise qualité des antigènes. On ne peut guère prédire quel lot d'antigène sera satisfaisant et quel autre ne le sera pas. Hardy et Nell [115] ont récemment fait part d'une étude détaillée de l'influence de divers facteurs sur

les capacités d'agglutinabilité des suspensions de tréponèmes, et particulièrement sur l'action de la température d'inactivation et de conservation de l'antigène, sur l'emploi de corps chimiques inactifs en remplacement du chauffage, sur le rôle du pH du milieu, et l'action des cations et chélateurs.

Dans leurs travaux antérieurs, les auteurs employaient des suspensions de tréponèmes tués par la chaleur et avaient constaté que de telles suspensions étaient faiblement agglutinables quand on les utilisait aussitôt après leur préparation alors qu'après un vieillissement de 7 à 8 mois à $+ 4^{\circ}\text{C}$ elles atteignaient leur maximum d'agglutinabilité. Un même résultat pouvait être obtenu également par un chauffage supplémentaire de l'antigène à 83°C , le temps à laisser à cette température dépendant de l'âge de la suspension. De leur récente étude, il ressort qu'il est préférable de ne pas inactiver l'antigène par la chaleur. Ils ont constaté en effet que des suspensions fraîches de tréponèmes, inactivées par addition de merthiolate, préparées et conservées à $- 4^{\circ}\text{C}$, atteignaient leur sensibilité maxima après 5 jours.

En ce qui concerne le pH, leurs essais ont montré qu'un milieu alcalin pH 8 est plus favorable que les zones neutre ou acide, principalement pour les antigènes préparés à $+ 4^{\circ}\text{C}$. Du fait que les suspensions de tréponèmes contiennent des traces de cations divalents tissulaires, puisque préparés à partir de testicules de lapin, les auteurs se sont demandé si ceux-ci pouvaient participer au processus responsable du développement de l'agglutinabilité. L'élimination de ces cations par un agent chélateur tel que l'E.D.T.A. a montré que leur présence était nécessaire pour l'obtention d'antigènes sensibles.

c) Mais au-delà des difficultés rencontrées dans la détermination du point final de la lecture et dans la préparation d'un antigène convenable, il reste encore un problème plus grand. Il a trait au type et à la signification des anticorps mesurés. Si l'on s'en tient à l'excellente corrélation des résultats obtenus par le T.P.I. et le T.P.A. dans les premières expériences, il semblerait donc que l'anticorps détecté par le T.P.A. soit semblable, sinon identique, à l'immobilisine. Cependant, des travaux ultérieurs de McLeod et Stokes ont montré clairement que la réagine est capable d'agglutiner les tréponèmes. La démonstration la plus convaincante de ce fait fut donnée par l'expérience d'immunisation de lapin avec un complexe réagine-lipide, qui détermine la production de réagine dans le sérum de lapin, celui-ci provoquant l'agglutination des tréponèmes.

On a montré également que l'absorption d'un sérum syphilitique avec l'antigène V.D.R.L. par exemple, élimine une partie de l'activité agglutinante de ce sérum. On sait, d'autre part, que la réagine seule n'entraîne pas l'immobilisation des tréponèmes dans le T.P.I. et que l'absorption de sérums syphilitiques par l'antigène V.D.R.L. ou l'ultra-centrifugation ne provoque que peu, sinon pas du tout, de changement du titre des immobilisines. *W. E. Vannier* a fractionné par électrophorèse un sérum de lapin syphilitisé et a constaté que, s'il est facile de séparer, dans des fractions distinctes du sérum, les immobilisines des réagines,

il n'en est pas de même pour les anticorps agglutinants. Il y a en effet présence d'éléments agglutinants dans toutes les fractions globuliniques du sérum, et ceci laisse à penser que plusieurs anticorps peuvent être responsables de l'agglutination des tréponèmes et non pas seulement la réagine et les anticorps du type immobilisine.

La réactivité des antigènes tréponémiques, pour agglutination avec la réagine, présente des problèmes complexes au point de vue diagnostic et immunologique. Hardy et Nell proposaient dans leur première technique d'éliminer la réagine des sérums par absorption avec l'antigène V.D.R.L. avant de les soumettre à l'agglutination. Reste à savoir si cette solution est pratique. Bien que Hardy prétende avoir de bons résultats avec une seule absorption, il peut se faire que cela soit insuffisant pour éliminer la totalité des réagines et surtout, cela varie beaucoup d'un sérum à l'autre. Dans certains cas, il est nécessaire de faire plusieurs absorptions répétées pour éliminer toute la réagine et, finalement, il paraît indispensable de vérifier, après la première absorption, la présence ou l'absence de réagine.

La question est plus complexe encore depuis les récents travaux de Hardy et Nell. Selon que l'antigène est inactivé par chauffage ou préparé à $+4^{\circ}\text{C}$ et inactivé par addition de merthiolate, les anticorps décelés par l'un ou l'autre sont de deux ordres différents. Des expériences d'absorption ont nettement mis en évidence ce phénomène. Ces recherches montrent que les tréponèmes chauffés absorbent l'anticorps agissant avec l'antigène thermostable, tandis que les tréponèmes non chauffés, bien qu'apparemment capables d'absorber les deux anticorps éliminent plus complètement celui correspondant à l'antigène thermolabile du tréponème. Des faits plus nets encore montrant la présence d'antigènes thermostable et thermolabile dans le tréponème pâle, furent obtenus en étudiant des sérums de lapins artificiellement immunisés par injections I.V. répétées de tréponèmes tués, soit par chauffage à 100°C , soit avec du merthiolate sans chauffage. On peut constater que les lapins immunisés avec des tréponèmes non chauffés, développent des agglutines vis-à-vis des antigènes aussi bien chauffés que non chauffés, tandis que les animaux préparés avec les tréponèmes chauffés, développent des agglutinines vis-à-vis des antigènes chauffés, en forte quantité, mais peu seulement vis-à-vis de l'antigène non chauffé.

CONCLUSION

Les réactions d'agglutination des tréponèmes présentent des avantages certains, mais aussi de graves inconvénients. Elles utilisent des antigènes facilement conservables, puisqu'il s'agit de tréponèmes tués, avantage sur le T.P.I. pour lequel l'antigène est le tréponème vivant et mobile. La technique en est très simple et consiste à mettre en contact le sérum avec l'antigène et à faire la lecture de l'agglutination à l'ultra-microscope. Malheureusement, cette lecture n'est pas toujours facile en raison de la difficulté d'appréciation du degré d'agglutination, difficulté

encore plus grande dans les mesures quantitatives. De plus, la reproductibilité des suspensions antigéniques est très inconstante, sans que l'on puisse, le plus souvent, en connaître les raisons. Si dans l'ensemble, les résultats concordent avec ceux du T.P.I., des travaux récents ont montré que l'anticorps agglutinant n'est pas le même que l'anticorps immobilisant et que la propriété agglutinante est répartie sur diverses fractions de la globuline sérique, indiquant que plusieurs anticorps participent à ce phénomène. Pour le T.P.I., la présence simultanée d'immobilisines et de réagines ne nuit nullement à la spécificité de la réaction, alors que pour l'agglutination, la majorité des auteurs conseillent d'éliminer les réagines du sérum avant d'entreprendre la réaction, celles-ci pouvant entraîner une positivité non spécifique.

CHAPITRE VI

LES ANTIGÈNES TRÉPONÉMIQUES FOURNIS PAR LA SOUCHE REITER (Contribution personnelle)

I. HISTORIQUE

L'impossibilité de cultiver le *tréponème pâle* de la syphilis avait déterminé Wassermann, en 1906, à utiliser comme antigènes des extraits d'organes riches en spirochètes, antigènes qui furent très vite remplacés par des lipides organiques en solution alcoolique, à la suite des travaux de Levaditi et Landsteiner. Noguchi [116-117], en 1911, ayant réalisé une culture de spirochètes qu'il pensait être *Treponema pallidum*, obtint des résultats satisfaisants et conclut à la supériorité de sa réaction qui mettait en évidence des anticorps spécifiques dans le sérum, alors que celle de Wassermann révélait seulement la présence de substances lipotropes dénommées actuellement « réagines ». Cependant, la majorité des auteurs, qui utilisèrent par la suite la culture de Noguchi, enregistrèrent des résultats contradictoires.

En 1929, Gaetgens [40-118-119], utilisant la culture de *tréponèmes de souche Reiter*, réussit à préparer un antigène d'une sensibilité supérieure à celle des extraits lipidiques et, d'après lui, d'une rigoureuse spécificité. En outre, il arriva même à séparer par absorption les réagines des substances réagissant spécifiquement vis-à-vis des tréponèmes, et les considéra comme les véritables anticorps de la syphilis, allant même jusqu'à nommer sa technique « Pallidareaktion ».

Les travaux de Gaetgens furent confirmés par Beck [120], par Eagle et Hogan [121] et surtout par l'école italienne avec d'Alessandro [122] et Puccinelli [123], mais contestés par Kolmer, Kast et Lynch [124-125-126]. Malgré toutes ces recherches, la Pallidareaktion resta pendant de longues années au stade expérimental, et ne fut utilisée que dans quelques laboratoires allemands.

L'introduction, en 1949, du test d'immobilisation de *Treponema pallidum*, par Nelson et Mayer, a résolu le problème du séro-diagnostic de la syphilis en ce qui concerne la *spécificité*. Mais la pratique du test

de Nelson restant, malgré les simplifications apportées à la méthode originale, délicate et difficilement réalisable pour la majorité des laboratoires, de nombreux auteurs ont recherché des méthodes plus simples et qui présenteraient la même sécurité quant à la spécificité. La réaction d'agglutination des tréponèmes, déjà réalisée par Touraine, en 1912, a fait de nouveau l'objet de nombreux travaux, principalement ceux de Hardy et Nell, et ceux de McLeod et Magnuson, mais n'est pas encore arrivée au stade de la pratique courante.

Ce sont ces mêmes raisons qui déterminèrent certains chercheurs à entreprendre de nouveaux travaux avec l'antigène fourni par la souche Reiter, parmi lesquels nous citerons, en France, Brottes [127], Pautrizel, Szersnovicz et Gimenez [128], Sohier, Benazet, Brottes et Thivolet [129], Hardy, Boruand et Durel [130], Gastinel, Vaisman et Hamelin [20-22-23]. Nous nous sommes particulièrement attachés à l'étude de cette question et principalement à l'obtention d'antigènes plus sensibles et plus stables que ceux jusqu'alors utilisés. Notre but fut atteint en soumettant les spirochètes à la désintégration ultrasonique.

II. PRÉPARATION DE L'ANTIGÈNE REITER

L'origine de la souche Reiter est assez obscure. Selon Muster [131], la souche aurait été isolée en 1922 par Wassermann et Ficker [132], puis reprise par Reiter [133-134], qui l'adapta à un milieu de culture relativement simple. C'est ainsi qu'elle prit le nom de Reiter. Mais quant à l'origine de l'isolement, elle reste parfaitement inconnue. Morphologiquement, ce spirochète est différent de *Treponema pallidum* et les cultures sont dépourvues de toute virulence pour les animaux sensibles à la syphilis.

Morphologie, propriétés culturelles, cycle évolutif et besoins nutritifs ont été particulièrement bien étudiés par Eagle et Germuth [135], Gelperin [136] ainsi que par Rose et Morton [137].

Le tréponème *Reiter* cultive abondamment en milieu liquide, soit dans le milieu de Brewer au thioglycolate (a) additionné de 10 % de sérum inactivé, soit simplement dans un bouillon peptoné et glucosé (b) avec également 10 % de sérum.

a) Composition du milieu de Brewer au thioglycolate. (Bacto Brewer thioglycolate medium).

(Difco Laboratories, Detroit, Michigan, U.S.A.)

Bouillon de bœuf.....	500 g
Cl Na	5 g
Phosphate dipotassique	2 g
Protéose-peptone	10 g
Dextrose	5 g
Thioglycolate de sodium	0,5 g
Agar-agar.....	0,5 g
Bleu de méthylène	0,002 g
Eau distillée.....	q.s.p. 1 000 ml

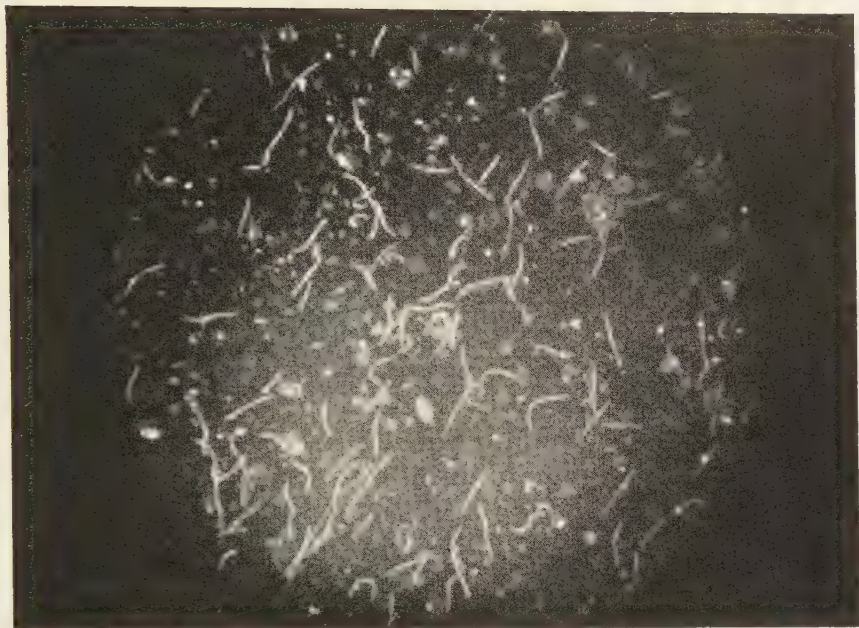


FIG. 9
Aspect de *Treponema pallidum*, examiné à l'ultramicroscope
(grossissement $\times 1\,600$).

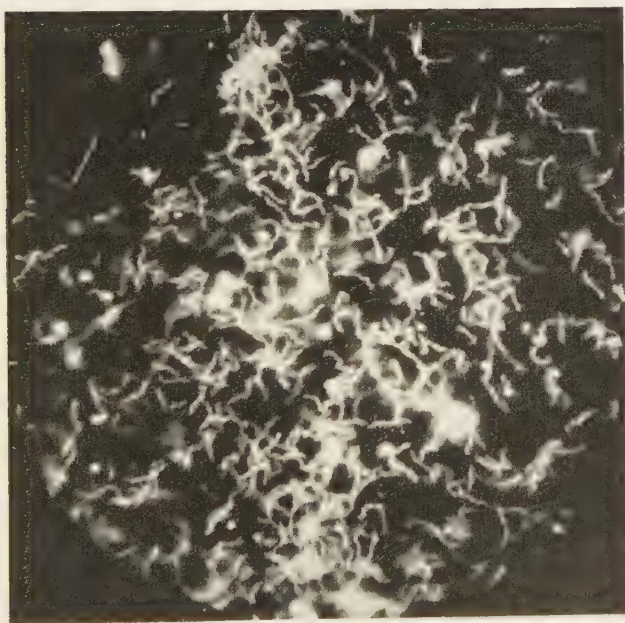


FIG. 10
Aspect du tréponème de culture, souche Reiter, examiné à l'ultramicroscope
(grossissement $\times 1\,600$).

b) Composition du bouillon peptoné et glucosé.

Bouillon de bœuf.....	1 000 g
Peptone.....	20 g
Glucose.....	1 g
Cl Na	5 g
Agar-agar.....	0,2 g
Bleu de méthylène	0,001 g

Répartir l'un ou l'autre de ces milieux en tubes à essai sous le volume de 10 ou 20 ml, et stériliser par autoclavage. Ajouter le sérum de cheval, de lapin ou humain, chauffé 2 heures à 58 °C et stérilisé par filtration. Il n'est nullement nécessaire de se mettre en conditions d'anaérobiose.

Des cultures de 8 jours sont centrifugées à 6 000 t/mn pendant 20 minutes et le dépôt tréponémique est lavé à plusieurs reprises avec de l'eau physiologique pour être remis finalement en suspension dans de l'eau physiologique phénolée à 3 g /₁₀₀.

Cette suspension servira comme antigène sous plusieurs formes :

- Utilisation de la suspension des corps microbiens, telle quelle ;
- Suspension soumise à la cryolyse pour désintégrer les tréponèmes ;
- Suspension désintégrée par action des ultra-sons ;
- Extraction d'une fraction protéique des tréponèmes (A.T.P.S.).

Ces différentes préparations sont utilisées en réaction déviation du complément et nous allons décrire la manière de les obtenir.

A. Suspension brute de corps spirochéliens.

1° Le *Palligen*, que Gaehtgens préparait en 1929, n'était pas autre chose que cette suspension brute de tréponèmes en eau physiologique phénolée. Elle contenait environ 10⁹ organismes par millilitre. Selon l'auteur, le rôle de l'acide phénique, en dehors de son pouvoir conservateur, est de renforcer le pouvoir antigénique de la préparation. Cet antigène n'est utilisable que faiblement dilué, sinon il perd toute sa sensibilité. Or, il possède un fort pouvoir anticomplémentaire ce qui oblige à utiliser un système hémolytique relativement fort et à travailler à la limite de son pouvoir anticomplémentaire. De plus, celui-ci augmente encore avec le vieillissement des suspensions limitant à quelques mois son utilisation. Actuellement, l'antigène allemand porte le nom de *Pallida-antigen*.

2° Le *Pallignost*, préparation italienne de l'Institut Sérothérapique de Milan, est du même type que le *Palligen* et en présente les mêmes inconvénients. L'Institut Sérothérapique de Sienne prépare également un antigène du même genre appelé *Tréponine*.

3° Nous avons également préparé [20-22-23] un antigène du même type, c'est-à-dire une suspension de tréponèmes *Reiter* en eau physiologique phénolée à 3 g /₁₀₀, antigène qui fut comparé au *Pallida-antigen* et au *Pallignost*, sur environ 1 500 sérums et donna des résultats exactement superposables.

B. Antigène obtenu par cryolyse.

Dans le but de réduire le pouvoir anticomplémentaire des préparations précédentes, nous nous sommes demandé si la destruction des tréponèmes par cryolyse serait avantageuse. Nous avons donc soumis des suspensions aqueuses de spirochètes à des congélations et décongélations brutales, les faisant passer successivement de 37 °C à — 76 °C et *vice versa* quinze fois de suite. Après une légère centrifugation, le liquide surnageant est recueilli et constitue l'antigène. Il se montre doué d'un pouvoir anticomplémentaire beaucoup plus faible comparativement à la suspension brute, tout en gardant, à la même dilution, la même sensibilité.

C. Antigène ultrasoné.

Une autre méthode permettant de préparer un antigène moins anticomplémentaire que la suspension brute de tréponèmes, est la désintégration des parasites par les ultra-sons, méthode simple et pratique que nous avons mise au point à l'Institut Alfred Fournier.

La suspension de tréponèmes *Reiter* lavés, remis en eau physiologique phénolée, est soumise à l'action des ultra-sons. La désintégration est effectuée en faisant agir sur la suspension de spirochètes, pendant 30 minutes, une fréquence de 960 kHz, avec une puissance acoustique totale de 100 W, dans une cloche cylindrique en verre dont le fond est formé d'une membrane de nitrocellulose (épaisseur : 0,03 mm) perméable aux ultra-sons. Pour éviter les actions oxydantes au cours de l'opération, les vibrations ultrasonores sont appliquées en atmosphère d'Hydrogène.

L'antigène ainsi préparé se présente sous l'aspect d'une suspension légèrement opalescente et très homogène, constituée de fines granulations provenant des corps tréponémiques qui ont été entièrement désintégrés. On la soumet à une légère centrifugation, et le liquide surnageant constitue la préparation antigénique qui est titrée selon la technique de Boerner et Luckens, en vue d'une réaction de fixation de complément à froid, du type B.W. Kolmer.

Pour notre part, cet antigène de préparation assez facile s'est révélé le plus maniable de toutes les préparations faites à partir de tréponèmes de culture *Reiter*. Il en est de même pour de nombreux autres auteurs, parmi lesquels Pautrizel et ses collaborateurs [138], en particulier, Bonnardot [139], qui consacra sa thèse à l'étude de cette préparation.

D. Extrait protéique (A.T.P.S.).

D'Alessandro et Dardanoni [140] ont préparé, toujours à partir de la souche *Reiter*, un extrait protéique *Antigene Treponemico Proteico Solubile*, connu sous l'abréviation A.T.P.S. Il s'agit d'un antigène protéinique purifié, préparé selon les procédés suivants : trois méthodes d'isolement de la substance antigénique des tréponèmes peuvent être mises en œuvre :

1° Soit extraction, par contact prolongé à froid, des tréponèmes *Reiter*, avec du chlorure de potassium. — A 1 gramme de spirochètes humides, lavés, ajouter 20 ml de KCl N à 2 °C. Laisser 7 jours en contact au fri-

gidaire. Centrifuger et traiter le sédiment de nouveau par 10 ml de KCl N. Centrifuger et soumettre le culot à une nouvelle extraction. Les 40 ml d'extraits une fois réunis, sont dialysés en sac de cellophane, contre de l'eau physiologique jusqu'à épuisement du KCl. Centrifuger alors à 3 000 t/mn pendant 1 heure pour éliminer la plus grande partie des tréponèmes. Garder le liquide surnageant.

2° *Soit désintégration par les ultra-sons.* — La suspension de tréponèmes lavés en eau physiologique est soumise aux ultra-sons tout en étant gardés dans la glace. Faire trois traitements ultrasoniques, d'une durée de 20 minutes, à 10 minutes d'intervalle. Centrifuger à 3 000 t/mn pendant une heure. Le culot, remis en suspension, est soumis de nouveau, de la même manière, aux ultra-sons. Centrifuger de nouveau et réunir les deux liquides surnageants.

3° *Soit enfin congélations et décongélations successives, ou cryolyse.* — La suspension lavée de tréponèmes Reiter en eau physiologique est congelée à -70°C puis décongelée à 37°C (10 minutes pour chaque température) cela quinze fois de suite. Centrifuger, recueillir le liquide surnageant et traiter de nouveau le culot de la même manière. Faire ainsi cinq extractions successives sur le culot de centrifugation. Les liquides surnageants réunis se présentent avec un aspect opalescent.

Les extraits, préparés à l'aide d'une quelconque de ces trois méthodes, sont placés en sac de cellophane et dialysés à pH 7.2 - 7.4 contre une solution de sulfate d'ammonium dont on augmente progressivement la concentration (10 %, 20 %, 50 %, 75 %). Le liquide contenu dans le sac de cellophane devient de plus en plus opalescent et diminue de volume. Centrifuger ce résidu à 3 000 t/mn pour éliminer le liquide surnageant et le dissoudre dans un tampon de pH 7.2 dans la proportion de 2 ml par gramme de tréponèmes humides (ce tampon consiste en 10.1 g de phosphate disodique, 1.4 g de phosphate monopotassique, 3.4 g de chlorure de sodium pour 1 000 ml d'eau distillée). Le liquide visqueux et opalescent obtenu est dialysé contre 2 litres du même tampon par 2 ml d'extrait. Après cette dialyse, l'extrait est dilué avec 5 ml de tampon par gramme de tréponèmes humides, puis centrifugé à 10 000 t/mn pendant 30 minutes pour éliminer les derniers spirochètes qui pourraient subsister. L'extrait finalement obtenu constitue l'A.T.P.S. et se présente comme un liquide légèrement opalescent.

En utilisant une technique de fixation de complément, d'Alessandro et Dardanoni ont noté l'extrême sensibilité de cet extrait qu'ils considèrent supérieure à celle des suspensions de tréponèmes.

Pisu et Mastromatteo [141] ont examiné de nombreux sérums avec l'A.T.P.S. et une suspension brute de tréponèmes Reiter et accordent également une spécificité et une sensibilité plus grandes à l'antigène protidique. Dans sa thèse, Lartigau [142] présente des recherches personnelles qui consistent en une étude comparative de différentes préparations tréponémiques, suspensions et extraits.

Nous avons poursuivi des investigations dans le même sens, en comparant les résultats obtenus avec d'une part, l'A.T.P.S., le *Pallida*-

antigen de Gaehtgens et des *suspensions de Reiter* préparées au laboratoire, d'autre part la sérologie classique comprenant le B.W. Kolmer, le B.W. Demanche, le Kline (antigènes à la cardiolipine pour les trois), le Kahn standard qualitatif et quantitatif, et enfin le test de Nelson. Il nous apparut que l'A.T.P.S. n'était pas anticomplémentaire à la dilution de 1/16, titre d'utilisation, et même à des concentrations plus fortes telles que le 1/4. Sa zone de réactivité est plus large que celle des autres préparations et il s'est révélé plus sensible que le Pallida-antigen. Toutefois, s'il est plus facile à manipuler, on ne gagne rien en sensibilité ni spécificité comparativement à nos préparations ultrasonées.

III. TECHNIQUE DE LA RÉACTION

A. Titrage de l'antigène.

Quelle que soit la préparation antigénique que l'on utilise, celle-ci doit être titrée, pour déterminer le taux de dilution optima de l'antigène pour la réaction. Ce titrage est effectué selon la technique de Boerner et Luckens.

B. Titrage du système hémolytique.

La technique de fixation de complément qui se prête le mieux pour l'utilisation de ces antigènes tréponémiques, est celle du type Kolmer, par fixation du complément à froid et pendant 18 heures.

Le réglage du système hémolytique est déterminé selon la technique classique de Kolmer, en présence de l'antigène dilué au taux trouvé par le précédent titrage.

C. Réaction proprement dite.

La réaction qualitative est réduite à deux tubes par sérum à examiner, un tube réaction et un tube témoin sérum, sans antigène. A titre d'exemple, voici le tableau d'une réaction, les titrages préalables (antigène et système hémolytique) étant déjà effectués.

	TUBE RÉACTION	TUBE TÉMOIN
	ml	ml
Sérum suspect inactivé.....	0,05	0,05
Antigène tréponémique dilué.....	0,15	—
Eau physiologique.....	—	0,15
Complément dilué à 2 unités par millilitre..	0,3	0,3
Fixation de 18 heures à + 6 °C.		
Réchauffer les tubes 10 minutes à 37°C.		
Hématies de mouton à 2 %.....	0,15	0,15
Hémolysine antimouton diluée à 4 unités par millilitre.....	0,15	0,15
Bain-marie à 37 °C jusqu'à hémolyse des tubes témoins.		

Il est indispensable de prévoir, pour chaque série de réaction, un tube témoin antigène qui doit hémolyser totalement (contrôle de son pouvoir anticomplémentaire), un sérum négatif connu et un sérum positif

connu, dilué de manière à donner 50 % d'hémolyse, servant de contrôle de la sensibilité de la réaction.

La réaction quantitative se pratique de la même manière sur des dilutions progressives du sérum. La positivité s'exprime par l'inverse de la dilution la plus grande qui donne encore une réaction à 50 % d'hémolyse.

IV. RÉSULTATS

Tous les auteurs qui étudièrent ces antigènes sont d'accord pour leur reconnaître les qualités déjà mentionnées, c'est-à-dire sensibilité et spécificité plus grandes que celles des antigènes lipidiques et même cardiolipidiques.

Les résultats de nos propres essais, comportant la comparaison pour tous les sérums, de la fixation de complément à l'antigène Reiter ultrasoné, avec le test d'immobilisation des tréponèmes (T.P.I.) et la sérologie classique (B.W. Demanche, B.W. Kolmer, Kline et Kahn standard), sont condensés dans le tableau XXVI.

TABLEAU XXVI

ÉTUDE COMPARATIVE DE LA SENSIBILITÉ ET DE LA SPÉCIFICITÉ
(statistique personnelle)

	1	2	3	4	5	6	7	8
T.P.I.	+	—	—	—	—	—	—	—
Reiter	+	—	—	—	+	+	+	—
B. W.	+	—	—	+	—	+	—	+
Nombre de sérums..	209	201	10	15	38	10	4	24
Pourcentage	40,90	39,35	1,95	2,95	7,45	1,95	0,75	4,70

Ce tableau permet de constater, d'une part une *concordance* (colonnes 1 et 2) de positivité ou de négativité dans 80,25 % des cas, dans les trois types de méthodes sérologiques utilisées ; d'autre part, des *discordances* dans 19,75 % des cas.

Si l'on prend le T.P.I. comme *critère de sensibilité* et de *spécificité*, on remarque que le Reiter aura manqué de sensibilité pour 4,90 % des sérums (colonnes 3 et 4), et le B.W. dans 9,40 % des cas (colonnes 3 et 5). De même, la spécificité du Reiter a été en défaut dans 2,70 % des cas (colonnes 6 et 7) alors que les réactions faussement positives de la sérologie classique s'élèvent à 6,65 % (colonnes 6 et 8).

CONCLUSION. — Ces antigènes présentent un grand progrès sur les réactifs lipidiques employés en sérologie classique, du fait de leur plus grande sensibilité et meilleure spécificité. Cependant, leur manipulation est plus délicate. Les extraits bruts, du type *Pallignost* et *Pallida-antigen*,

sont fortement anticomplémentaires et leur zone de réactivité est très étroite. Les antigènes *cryolysés* ou *ultrasonés* pour lesquels on se débarrasse par centrifugation de la plus grande partie des corps spirochéliens sont plus maniables et beaucoup moins anticomplémentaires à la dilution de leur sensibilité optima. En ce qui concerne l'extrait purifié protéinique, *A.T.P.S.*, si dans l'ensemble, sa sensibilité est voisine de celle des autres préparations sans toutefois atteindre le même degré, sa préparation est fort délicate, longue, et le rendement très faible. Par contre, pour d'Alessandro et Dardanoni, sa spécificité est supérieure.

En conclusion, si ces antigènes peuvent être utiles dans certains cas, on ne peut les substituer complètement à la sérologie classique, ni leur attribuer la même valeur qu'au test d'immobilisation de *Treponema pallidum*.

V. ÉTUDE EXPÉRIMENTALE

Vu l'intérêt que présentent ces antigènes tréponémiques de culture pour la sérologie de la syphilis, il était intéressant également d'étudier l'évolution des anticorps antitréponémiques au cours de l'infection spécifique expérimentale et humaine, le comportement du lapin neuf vis-à-vis d'injections de tréponèmes *Reiter*, la séparation possible des divers anticorps vis-à-vis des antigènes homologues, le fractionnement et les propriétés antigéniques des fractions isolées à partir de la culture de *Reiter*, et enfin les phénomènes de sensibilisation des lapins syphilités ou préparés avec des tréponèmes *Reiter*, détectables par les divers antigènes de culture proposés.

A. Évolution des anticorps antitréponémiques au cours de la syphilis expérimentale du lapin.

Cette expérimentation a été réalisée par Pautrizel et ses collaborateurs [138]. Ils ont suivi l'apparition et l'évolution des anticorps anti-*Reiter* et antilipidiques chez huit lapins syphilités expérimentalement et non traités. Ils ont régulièrement constaté que, pour les huit lapins, les anticorps anti-*Reiter* apparaissaient avant l'anticorps antilipidique et plus intensément aussi que ce dernier. Cette discordance est surtout nette dans les trois à quatre premiers mois de l'infection ; plus tard, les titres des deux anticorps considérés se rapprochent et tendent à s'égaliser.

Cette précocité de l'anticorps anti-*Reiter* au début de l'infection syphilitique expérimentale se retrouve également dans la syphilis humaine, au stade primaire. Nous avons maintes fois vérifié ce fait et c'est un des avantages que l'on reconnaît à ces antigènes tréponémiques de culture.

Quelle peut être, d'autre part, l'évolution des mêmes anticorps lorsque l'on arrête, chez l'animal, l'infection par un traitement spécifique ? Deux alternatives sont à considérer selon que ce traitement est institué à la phase précoce ou tardive de la maladie. Chez des lapins récemment syphilités et traités par la pénicilline entre le 25^e et le 33^e jour après l'inoculation infectante, on constate une chute immédiate et rapide du titre en anticorps anti-*Reiter*, alors que les réagines, moins

dociles à la thérapeutique, décroissent plus lentement et ne disparaissent totalement que les dernières.

Au contraire, lorsque l'animal est traité tardivement, soit 116 à 360 jours après l'inoculation, la disparition des anticorps est inversée. Le traitement entraîne tout d'abord une élévation du titre en réagine alors que l'anticorps anti-Reiter reste peu influencé ; par la suite, les réagines accusent une chute assez rapide alors que l'anticorps anti-tréponémique décroît beaucoup plus lentement et disparaît le dernier.

B. Comportement du lapin neuf vis-à-vis d'injections de tréponèmes *Reiter*.

On sait que, très fréquemment, le sérum de lapin normal donne des réactions positives, à un taux relativement faible cependant, avec les antigènes lipidiques, que ce soit en réactions d'hémolyse ou en floculation. Au contraire, comme nous l'avons déjà vu, chez l'animal sain, il n'a jamais été décelé d'immobilisines antitréponémiques (test de Nelson négatif). En ce qui concerne le tréponème *Reiter*, comme vis-à-vis des antigènes lipidiques, l'animal neuf répond par une certaine positivité. Nous avons fréquemment trouvé des titres variant entre 4 et 8 unités pour les réactions de fixation de complément, et de son côté, Kolmer [143] a constaté que le sérum des animaux neufs contient presque toujours des agglutinines agissant sur les diverses souches de tréponèmes de culture, *Reiter*, *Kazan*, *Noguchi*, *Króó*, etc.

Nos essais nous ont montré que l'introduction de tréponèmes *Reiter* vivants ou tués, chez le lapin, par voies intrapéritonéales ou intraveineuses, exalte fortement la production d'anticorps *Reiter*, alors que le test de Nelson reste complètement négatif.

Kolmer [143], opérant avec six souches différentes de tréponèmes de culture, parmi lesquelles la souche *Reiter*, obtint constamment la production d'anticorps pour la souche homologue, et dans certains cas et à un plus faible degré, pour les souches hétérologues, ce qui indique qu'il y a lieu de considérer ces positivités comme des réactions de groupe.

D'autre part, tous les lapins préparés avec de fortes quantités de tréponèmes *Reiter* vivants restent réceptifs à une inoculation virulente de *Treponema pallidum*, et parfois même ces animaux développent des lésions syphilomateuses plus intenses que les animaux témoins.

C. Séparation des divers anticorps vis-à-vis des antigènes homologues.

Si l'on considère un sérum de sujet humain syphilitique donnant des réactions positives avec les antigènes lipidiques ainsi qu'avec l'antigène tréponémique *Reiter*, on peut se demander si l'élimination des réagines de ce sérum laissera intacte encore la positivité vis-à-vis du *Reiter* ; autrement dit, un seul anticorps intervient-il pour les deux antigènes, ou bien s'agit-il de deux anticorps différents ? Nous avons réalisé l'expérience suivante qui démontre qu'il s'agit de deux anticorps distincts :

2 ml d'un sérum humain syphilitique inactivé sont absorbés par un antigène de Kline, à deux reprises, et débarrassés du précipité par centri-

fugation. Le liquide surnageant se montre négatif aussi bien pour les réactions d'hémolyses que pour celles de floculations avec les antigènes lipidiques, tandis que son titre de positivité vis-à-vis de l'antigène *Reiter* reste inchangé.

L'expérience d'absorption inverse, c'est-à-dire élimination des anticorps *Reiter* par l'antigène homologue a été réalisée par Kolmer et ses collaborateurs [143].

1 ml de sérum humain syphilitique est mis en contact avec des tréponèmes obtenus par centrifugation de 5 ml d'une suspension phénolée de souche *Reiter*. Le mélange est agité pendant 5 minutes à environ 200 oscillations par minute, à la température du laboratoire. Après 30 minutes de centrifugation, le liquide surnageant est décanté et soumis de nouveau à deux absorptions semblables. Après la troisième absorption, le liquide surnageant centrifugé est soumis aux réactions sérologiques lipidiques et tréponémiques. On constate alors que la positivité vis-à-vis de l'antigène *Reiter* est fortement diminuée alors qu'elle reste inchangée pour les réactifs lipidiques (Kolmer, Kahn, Kline).

Ainsi, il est donc bien démontré que les anticorps « antilipidiques » et « anti-Reiter » sont deux éléments différents, nettement individualisés. Kolmer, Kast et Lynch [143] ont répété cette même expérience avec d'autres souches tréponémiques de culture, telles les souches *Króo*, *Nichols-Hough*, *microdentium* et *macrodentium*, *Noguchi*, toutes ces souches ayant les mêmes propriétés antigéniques que la souche *Reiter*. Dans l'ensemble, l'absorption de l'anticorps par la souche homologue est plus complète qu'avec les souches hétérologues, mais il n'y a aucune absorption croisée avec les antigènes lipidiques.

D. Fractionnement antigénique des tréponèmes *Reiter*.

Des expériences d'absorption précédentes on pouvait conclure que le tréponème *Reiter* ne se comportait pas simplement comme un antigène lipidique. L'école italienne, avec d'Alessandro Oddo, Comes et Dardanoni [144] s'est attachée à l'étude du fractionnement des suspensions de tréponèmes *Reiter* et leurs travaux ont abouti à la séparation de trois composants :

- une fraction thermolabile, essentiellement protidique,
- une fraction thermostable, de nature polysaccharidique,
- une fraction lipidique correspondant à l'antigène ubiquitaire du type cardiolipine.

Résumant l'essentiel de leurs travaux, nous envisagerons successivement chacune de ces fractions.

1^o FRACTION PROTIDIQUE. — Déjà l'idée de fractionnement de l'antigène *Reiter* avait été soulevée par Gachtgens et divers auteurs. En particulier, Grunberg [145] et Beck [120] avaient essayé d'isoler la fraction spécifique par digestion trypsique, mais devant la faillite de leurs tentatives, ils avaient conclu que ce facteur spécifique était probablement de nature protéique.

D'Alessandro et son école [146] répétèrent ces essais et aboutirent

à l'isolement d'une fraction qui semblait être le support du facteur spécifique, et dont l'étude révéla la nature protidique. Elle peut être obtenue par désintégration des corps spirochètiens par cryolyse, précipitation par le sulfate d'ammonium du produit obtenu, suivie de dialyse contre l'eau distillée pour éliminer le sulfate d'ammonium. Le précipité obtenu est alors redissous dans l'eau physiologique. Cette fraction est inactivée par chauffage à 76 °C, par traitement à l'alcool, et sa réactivité sérologique disparaît après digestion protéolytique. Sa nature protéique est confirmée par Puccinelli et Bellone [147], qui constatèrent qu'elle se comporte comme un antigène complet doué d'une activité anticorpo-génétique constante chez l'animal inoculé. Celui-ci répond par formation d'anticorps homologues, ne réagissant pas avec les antigènes lipidiques. Ils sont indifférenciables de ceux qui se développent au cours de l'infection syphilitique. Sa molécule est d'un poids élevé et paraît être d'une grande complexité.

Depuis peu, d'Alessandro et Dardanoni [140] ont pu obtenir cette fraction protidique dans un état de pureté relative et, comme nous l'avons déjà vu, ils ont appelé cette substance A.T.P.S. (*Antigene Treponemico Proteico Solubile*). Son activité sérologique est démontrée et son intérêt est réel dans le diagnostic de la syphilis.

2° FRACTION POLYSACCHARIDIQUE. — Outre l'antigène protidique thermolabile, d'Alessandro isole du corps du tréponème *Reiter* une fraction antigénique thermostable différente sérologiquement de la précédente. Sa thermostabilité, l'impossibilité de l'extraire par l'alcool ou l'acétone, sa résistance à la digestion protéolytique par la papaïne, lui fit supposer que sa nature chimique s'apparentait aux polysides.

A l'origine, cette fraction fut isolée à partir des organismes désintégrés avec de la soude et traités à l'acide trichloracétique. Les protéines étant ainsi précipitées, le liquide surnageant est dialysé, puis additionné d'alcool qui précipite la substance polysaccharidique. Celle-ci est recueillie par centrifugation et redissoute dans l'eau physiologique.

Capable de réagir *in vitro* avec des sérums de lapins, inoculés avec des corps tréponémiques entiers, souche *Reiter*, cette fraction se comporte comme un haptène car, injectée à l'état pur à l'animal, elle ne déclenche pas la formation d'anticorps. Cependant, l'activité de cet antigène vis-à-vis des sérums spécifiques se montra faible et inconstante. Ces résultats peu encourageants arrêtaient toutes recherches pendant quelques années.

Récemment, d'Alessandro [148] a de nouveau attiré l'attention sur cette fraction. Il en reprit l'étude en ayant présent à la mémoire que, sur le plan général bactériologique, les antigènes polysaccharidiques ou lipopolysaccharidiques sont presque toujours considérés comme étant les composants des germes les plus en rapport avec leur immunogénicité et réagissent parfaitement bien *in vitro*.

Ce nouvel essai d'isolement de la fraction lipopolysaccharidique fut pratiqué sur le même principe que l'essai original, mais sur les organismes traités au désoxycholate de sodium au lieu de la soude comme moyen de désintégration. Cet antigène réagit en fixation de complément avec les anticorps produits chez le lapin par injections de suspensions de *Reiter* non désintégrés, de même qu'avec les sérums de lapins syphi-

lisés expérimentalement. Un petit nombre de sérums humains syphilitiques donnèrent également des réactions positives alors qu'une constante négativité fut observée avec des sérums de lapins normaux, de même qu'avec des sérums faussement positifs à la sérologie lipidique.

La sensibilité et la spécificité de cette fraction lipopolysaccharidique paraissent, au premier abord, très satisfaisantes, mais d'autres recherches sont nécessaires encore pour juger de sa valeur pratique.

3^o FRACTION LIPIDIQUE. — En soumettant les tréponèmes *Reiter* à une extraction alcoolique, on peut facilement obtenir une fraction de nature lipidique qualitativement identique à l'extrait alcoolique de cœur de bœuf, et quantitativement plus abondante dans les corps spirochètiens que dans le muscle cardiaque. Du point de vue sérologique, la fraction lipidique extraite des tréponèmes possède la même activité que l'antigène lipidique des tissus de mammifères. Si l'on admet la parenté sérologique entre le tréponème *Reiter* cultivable et *Treponema pallidum* virulent, pareilles constatations soulèvent naturellement le problème du rôle antigénique de ces lipides, à savoir leur pouvoir d'entraîner l'apparition des anticorps de Wassermann, autrement dit réagine, chez l'être vivant. Sachs, Klopstock et Weil [149] avaient émis l'hypothèse que des lipides tissulaires libérés au niveau des lésions syphilitiques par désagrégation cellulaire pouvaient s'unir aux protéines des tréponèmes pour former un antigène complet qui provoquerait la formation d'anticorps antilipides. Cependant, une autre hypothèse est plausible. Puisque des lipides rentrent dans la constitution des tréponèmes, ceux-ci pourraient donc agir par eux-mêmes, pour déclencher la production d'anticorps antilipidiques qui prendraient alors la signification d'anticorps spécifiques. Cependant, une large expérimentation a prouvé que ces anticorps antilipidiques ont une spécificité plus étendue, pouvant réagir avec des lipides de provenance différente, et pouvaient être considérés comme des anticorps de groupe, lipodiques généraux.

En conclusion, dans la mosaïque d'antigènes que présente le tréponème *Reiter*, c'est sans doute la fraction protéique qui est la plus digne d'intérêt par le rôle qu'on lui attribue d'être le support de la spécificité antigénique.

E. Recherches de l'état de sensibilisation chez l'homme et chez l'animal (Recherches personnelles).

Il nous a paru intéressant [25] de rechercher s'il existe chez le syphilitique une sensibilisation à l'antigène *Reiter* comme elle se manifeste vis-à-vis de *Treponema pallidum* (luotest), et de même, d'étudier le comportement du lapin syphilitisé ou préparé par des injections de tréponèmes de culture, à l'égard de l'antigène *Reiter*.

1^o RÉPONSE DES SUJETS HUMAINS SYPHILITIQUES A L'INTRADERMO-RÉACTION AVEC LA FRACTION PROTIDIQUE DU REITER.

Nos investigations ont porté sur un groupe de quinze malades syphilitiques à différentes périodes de l'infection : tabès, paralysie générale, syphilis tertiaires et secondaires, syphilis congénitales et enfin syphilis

anciennes à réactions humorales non réduites. Signalons également un cas de syphilis occulte seulement détectée par les tests sérologiques. Enfin, un témoin atteint d'eczéma a été joint à la liste. Chez tous ces sujets, des intradermo-réactions ont été pratiquées avec de la luétine et avec de l'antigène protéinique A.T.P.S. En aucun cas, l'antigène protéinique Reiter ne provoqua de processus réactionnel quelconque. A l'inverse, les sujets atteints de syphilis tertiaire et congénitale fournirent à la luétine une réponse fortement positive; elle fut seulement très légère au cours de la syphilis secondaire. Il est ainsi prouvé que, chez l'ancien syphilitique, l'A.T.P.S. ne peut déceler aucune sensibilisation allergique, alors même que la luétine donne une réaction positive conformément à ce que l'on sait depuis longtemps.

2° RECHERCHE DE LA SENSIBILISATION DES LAPINS SYPHILISÉS VIS-A-VIS DES ANTIGÈNES DU TRÉPONÈME REITER.

Nous avons utilisé des séries de lapins dont l'infection s'échelonnait de 55 à 880 jours, et nous avons éprouvé leur sensibilisation comparée à des émulsions de tréponèmes Reiter vivants ou tués, avec différents extraits antigéniques de ce tréponème et également avec une suspension de tréponème pâles formolés, la luétine.

— Des lapins syphilités depuis 55, 161 et 414 jours, n'ont présenté aucune sensibilisation vis-à-vis des *tréponèmes Reiter tués par la chaleur* (30 minutes à 60 °C) et pas davantage d'ailleurs vis-à-vis de la luétine.

— Chez des lapins syphilités depuis 147 jours, l'injection intradermique de *tréponèmes Reiter vivants* entraîne, dans les 48 heures, la formation d'une papule infiltrée avec aréole rouge vif qui disparaît en 24 heures. Cette manifestation allergique ne s'obtient qu'en utilisant un antigène assez concentré, dont la dilution limite d'activité est de 10^{-1} .

— Le même type d'expérience fut réalisé sur des lapins syphilités depuis 107 et 181 jours avec soit un antigène consistant en une *suspension formolée de Reiter*, soit une *suspension phénolée*. Ici aussi, les résultats furent positifs comme avec les Reiter vivants.

— Des lapins syphilités depuis 724 et 880 jours ont fourni une intradermo-réaction positive à l'*extrait protéinique A.T.P.S.* tandis que les *préparations ultrasonées ou cryolysées de Reiter* n'ont donné que des résultats négatifs.

Ces protocoles expérimentaux montrent que, chez les animaux syphilités, on peut déceler un état allergique, surtout quand l'infection dépasse 100 jours et en atteint même plusieurs centaines. Les antigènes luétiques ne nous ont pas fourni de réponse valable. Tout au contraire, les antigènes Reiter paraissent propres à détecter un état de sensibilisation, principalement lorsque l'on utilise l'antigène protéinique, l'A.T.P.S. italien. Les antigènes phénolés et formolés occupent une seconde place et nous ne retiendrons pas l'emploi des antigènes obtenus par cryolyse ou ultra-sons, pas plus que la suspension de tréponèmes Reiter tués par la chaleur.

L'interprétation de la réaction intradermique chez le lapin à l'antigène protéinique soulève quelques réserves. S'agit-il d'un test spécifique

d'une sensibilisation acquise ou traduit-il, d'une façon plus générale, une réactivité protéinique? Sans doute, tous les animaux témoins de ces essais n'ont-ils offert aucune réaction et, à s'en tenir à cette constatation, on pourrait en déduire la valeur et la spécificité de la réaction observée. Nous n'oserions cependant être complètement affirmatifs quand on connaît la facilité avec laquelle le tégument de lapin peut réagir aux différentes incitations.

3^o ÉTAT DE SENSIBILISATION DES LAPINS PRÉPARÉS PAR INJECTIONS RÉPÉTÉES DE SUSPENSIONS DE TRÉPONÈMES DE CULTURE.

Les injections étaient faites par voie péritonéale ou sous-cutanée à trois reprises. Dix jours après la dernière injection, une intradermo-réaction est effectuée avec une émulsion de tréponèmes Reiter vivants ou morts (tués par la chaleur à 60 °C). La réaction apparaît en 48 heures sous l'aspect d'une papule érythémateuse infiltrée s'effaçant en trois jours. Le lapin témoin ne réagit pas à l'apport de l'antigène. On note seulement une résorption assez lente du dépôt intradermique de l'émulsion, mais elle ne provoque ni rougeur, ni infiltration au point de l'injection. L'expérience répétée à plusieurs reprises donna toujours les mêmes résultats, à condition d'introduire, dans l'épreuve intradermique, une suspension concentrée de tréponèmes. Avec le mélange utilisé, la dilution limite était 10^{-1} .

Sur d'autres lapins préparés aussi par injections intrapéritonéales de suspensions de tréponèmes vivants Reiter, on observait que l'apport intradermique d'A.T.P.S. produisait une réaction de type allergique avec rougeur et infiltration nettes 48 heures après.

A l'opposé, les antigènes *Reiter* ultrasonés ou cryolysés ne donnaient aucune réponse. Le *Pallida-antigen* n'a fourni qu'une réaction éphémère et le *Pallignost* demeurait sans effet. Les témoins de ces expériences n'offrirent rien à ces différents tests. Ajoutons que la luétine utilisée par voie intradermique chez ces lapins ainsi préparés avec le tréponème de culture ne détermina aucun phénomène réactionnel.

Il est donc possible de noter un état allergique chez le lapin préparé avec le Reiter en utilisant, pour l'épreuve intradermique, le tréponème vivant ou mort et aussi l'A.T.P.S. La sensibilisation détectée par ce dernier antigène chez les lapins préparés semble persister assez longtemps. Nous l'avons retrouvée avec netteté le 55^e jour après la fin de la préparation des animaux et même au 198^e jour, mais sous une forme atténuée. Les lapins témoins confirment l'absence totale de réaction.

En résumé, ces essais mettent en évidence une opposition entre les résultats obtenus chez l'homme syphilitique, qui réagit à la *luétine*, mais nullement à l'*antigène Reiter*, alors que le lapin syphilitisé ou immunisé par le Reiter répond toujours, dans les deux cas, négativement à la *luétine*, et positivement à l'*antigène Reiter*.

Il est difficile d'interpréter cette différence dans le comportement humain et animal à l'égard de l'antigène Reiter. La sensibilisation du syphilitique accuse, semble-t-il, une spécificité beaucoup plus étroite que celle du lapin, puisque cet animal, infecté avec *Treponema pallidum*, réagit fortement et principalement à l'A.T.P.S. Il ne faut pas oublier

cependant que le lapin offre une particulière facilité à se sensibiliser. On sait que, chez cet animal, préparé par du sérum de cheval, des injections de différentes protéines provoquent le choc typique. Inversement, s'il est préparé par diverses protéines, il réagit au sérum de cheval comme s'il avait été séro-anaphylactisé. Il n'est pas nécessaire d'insister sur ces faits bien connus, qui soulignent les réserves formulées plus haut sur la spécificité réelle d'une réaction après injection intradermique d'une protéine comme l'A.T.P.S.

CONCLUSION

La sérologie classique lipidique, malgré les nouvelles méthodes employant les antigènes à base de cardiolipine, est encore souvent en défaut, soit par manque de sensibilité, soit, ce qui est encore plus grave, par non-spécificité. Le test d'immobilisation des tréponèmes, dont l'antigène est le tréponème pâle, vivant, lui-même, a résolu le problème de la spécificité du séro-diagnostic, mais sa réalisation reste délicate et difficilement praticable pour la majorité des laboratoires. Pour cette raison, ces dernières années, de nombreux auteurs ont repris l'antigène de Gaehstgens, préparé à partir des tréponèmes de culture Reiter.

Les nombreuses recherches que nous avons consacrées à cette réaction font ressortir le grand intérêt que présentent ces antigènes pour le séro-diagnostic de la syphilis, du fait de leur grande sensibilité, supérieure à celle des antigènes lipidiques, y compris ceux à base de cardiolipine. Cependant, leur spécificité, meilleure comparativement aux précédentes, n'atteint pas celle du test d'immobilisation des tréponèmes. En prenant comme base le test de Nelson, nos statistiques personnelles montrent pour l'antigène *Reiter*, un manque de sensibilité pour 4,90 % des sérums, tandis que la sérologie classique a été en défaut dans 9,40 % des cas; au point de vue spécificité, toujours par rapport au T.P.I., le Reiter a donné 2,70 % de réactions faussement positives, alors que la sérologie lipidique en donna 6,65 %. L'antigène *Reiter* apporte donc un progrès incontestable dans le séro-diagnostic de la syphilis, par rapport aux antigènes lipidiques ou cardiolipidiques.

Ces antigènes tréponiques *Reiter* mettent en évidence des anticorps différents de la réagine, anticorps qui sont décelables très précocement dans la syphilis primaire où la réaction est positive avant la sérologie classique, faits démontrés également par l'expérimentation sur le lapin et par des essais d'absorptions croisées.

CHAPITRE VII

UTILISATION DE *TREPONEMA PALLIDUM* PATHOGÈNE EN TANT QU'ANTIGÈNE POUR RÉACTION DE FIXATION DU COMPLÉMENT

(Préparation d'un antigène par action des ultra-sons — Travail personnel)

L'antigène Reiter apporte un progrès incontestable dans le séro-diagnostic de la syphilis, mais ne satisfait pas totalement du point de vue pratique et sur le plan immunologique. Il est, en effet, très éloigné de *Treponema pallidum*, et il serait de beaucoup préférable de lui substituer le véritable agent pathogène de la maladie comme antigène. Mais ce dernier, en suspension dans l'eau physiologique phénolée est très anti-complémentaire, plus encore que le Reiter, et pratiquement inutilisable.

Récemment, quatre techniques ont été proposées pour préparer, à partir de ce parasite, un antigène satisfaisant, pour réaction d'hémolyse. Il s'agit de celles de :

- I — Portnoy et Magnuson,
- II — Vaisman, Hamelin et Prudhomme,
- III — Orpwood Price et Whelan,
- IV — Dardanoni et Censuales.

I. TECHNIQUE DE PORTNOY ET MAGNUSON [150] [152]

Ces auteurs préparent un antigène à partir de *Treponema pallidum* virulent, par élimination de la fraction lipidique des parasites, puis extraction du matériel antigénique avec une solution de désoxycholate de sodium. L'antigène qui en résulte peut être utilisé en fixation de complément et les premiers essais ont démontré son intérêt dans la séro-réaction de la syphilis.

A. Préparation de l'antigène.

Chaque fois qu'il n'y aura pas d'indications spéciales, tous les réactifs seront maintenus à + 4 °C avant usage et toutes les opérations seront faites à cette température. On emploie les réactifs suivants :

— *Citrate de soude* (0,075 M) dissous dans l'eau distillée et stérilisé par autoclavage.

— *Solution extractive de désoxycholate*

$$\left\{ \begin{array}{l} 0,2 \text{ \% de désoxycholate de sodium} \\ 0,01 \text{ M de citrate de Na} \\ 0,1 \text{ M de Cl Na} \end{array} \right.$$

dissous dans de l'eau distillée et stérilisé par ébullition pendant 2 minutes. Cette solution est conservée à la température ordinaire. Le pH en est d'environ 7,4 à 7,5.

— *Acétone*.

— *Ether anhydre*.

Des lapins sont inoculés par voie intratesticulaire avec 10^8 de tréponèmes virulents (souche Nichols). Quand une belle orchite s'est développée, environ 10 à 12 jours après, les animaux sont tués par injection d'air I.V., les testicules sont prélevés stérilement et immédiatement placés à $+ 4^\circ\text{C}$. Ils sont ensuite coupés en tranches fines, mis en flacons stériles et l'extraction des tréponèmes est faite avec la solution de citrate de soude par agitation. On peut faire trois extractions successives des mêmes testicules. Le volume de solution citratée utilisé pour chaque période extractive est de 10 ml par testicule. A la fin de chaque extraction, le liquide surnageant est décanté et centrifugé faiblement pendant 10 minutes pour éliminer les plus grosses particules de tissus. La suspension de tréponèmes est ensuite fortement centrifugée à 20 000 t/mn pendant une heure, pour faciliter le dépôt des spirochètes. Une petite quantité de solution de Cl Na à M/7, stérile, est ajoutée à chaque culot de centrifugation, et on disloque le sédiment avec un agitateur stérile. Tous les sédiments sont mélangés dans un tube à centrifuger conique de 50 ml et on ajoute de la solution de Cl Na M/7 pour avoir un volume final d'émulsion correspondant à 2 ml par testicule. On homogénise la suspension et on centrifuge doucement pendant 10 minutes. Le liquide surnageant est décanté et centrifugé encore une fois à 20 000 t/mn pendant 1 heure. Le culot est repris par une solution de NaCl M/7, transféré dans un tube à centrifuger gradué stérile et on ajuste à 0,4 ml par testicule avec de l'eau physiologique.

La suspension, bien homogénéisée, est mélangée à deux fois son volume d'acétone. Après 1 heure d'extraction en agitant de temps à autre, on centrifuge doucement pendant 15 minutes; le liquide surnageant est rejeté et le culot re-extrait pendant toute la nuit avec le même volume d'acétone que celui qui a été mis à la première extraction. On recentrifuge, et le sédiment est extrait à l'éther deux fois de suite pendant 1 heure, et une fois pendant toute la nuit (même volume d'éther que celui d'acétone). Après la dernière extraction à l'éther, le sédiment est placé sous vide sulfurique, à l'obscurité, à la température ordinaire. Après quelques jours, le matériel sec est pulvérisé avec une spatule et

conservé sous vide jusqu'à l'extraction par la solution de désoxycholate.

Pour l'extraction de l'antigène, 1 ml de solution de désoxycholate est ajouté à 5 mg de poudre sèche, et la suspension est homogénéisée. Après 1 heure d'agitation rotative, la suspension est légèrement centrifugée pendant 15 minutes. Le surnageant est décanté et mis de côté. Le culot est repris avec la moitié du volume de solution de désoxycholate utilisée la première fois. La suspension est centrifugée, les deux liquides extractifs surnageants sont mélangés et placés en sac de cellophane. Le sac est attaché à un axe rotatif et dialysé contre une solution de NaCl M/7 pendant 48 heures. Il faut environ cinq fois 4 litres de solution salée pour dialyser 100 mg de poudre sèche. Après dialyse, le contenu du sac est centrifugé à 25 000 t/min. Le liquide surnageant, qui contient le principe actif, est conservé à -20°C jusqu'à son utilisation.

La solution antigénique extraite du tréponème virulent contient environ 25 mg % de protéine ; elle est légèrement opalescente, et elle perd progressivement son activité sérologique à la chaleur. Ainsi, chauffée au B.M. pendant 1 heure à 56°C , 69°C et 100°C , la perte d'activité est respectivement de 50, 90 et 100 %. Cependant, le pouvoir antigénique se conserve à -20°C pendant au moins 2 mois ou à $+4^{\circ}\text{C}$ pendant au moins 2 semaines. Les constantes chimiques sont les suivantes :

Phosphore.....	1,7 à 2 % (fait sur l'extrait lyophilisé)
N	7,3 %.
Protides totaux.....	21 à 30 mg %.
Pentose, glucose et fructose.....	non décelés.

Cet antigène n'est pas anticomplémentaire, même employé pur. Dans la pratique, on l'utilise dilué au 1/5.

B. Technique de fixation de complément.

La réaction de fixation avec l'extrait antigénique précédent est désignée par l'abréviation T.P.C.F. La technique est celle de Kolmer à doses réduites avec les modifications suivantes :

a) Dans le titrage du complément, celui-ci dilué au 1/50, est mis aux volumes de 0,3, 0,25, 0,2, 0,15 et 0,1 ml. La lecture est faite 30 minutes après l'addition du système hémolytique. On ne met pas d'antigène dans le titrage.

b) D'après le résultat du titrage, on utilise 1,5 unité de complément au lieu de 2, pour augmenter la sensibilité.

c) Les sérums sont inactivés 30 minutes à 56°C ou réchauffés 10 minutes s'ils ont été inactivés la veille. Pour les tests qualitatifs, le volume de sérum employé est de 0,2 ml au 1/5.

C. Résultats.

Une étude comparative sur 395 sérums humains [151], avec la sérologie classique (S.T.S.) par deux réactions, V.D.R.L. et Mazzini, le test d'immobilisation (T.P.I.) et la réaction de fixation avec l'antigène au désoxycholate (T.P.C.F.), est résumée dans le tableau XXVII :

TABLEAU XXVII

DIAGNOSTIC	NOMBRE DE CAS	S.T.S. POSITIVE (%)	T.P.I. POSITIF (%)	T.P.C.F. POSITIVE (%)
Syphilis primaire	70	55,7	34,8	57,1
Syphilis secondaire	49	67,3	77,6	87,3
Syphilis latente	201	81,6	89,1	87,1
Paralysie générale	24	87,5	95,8	83,3
Tabès.....	5	60,0	100,0	80,0
Syphilis cardiovasculaire..	6	83,3	83,3	83,3
Syphilis congénitale.....	34	94,1	94,1	100,0
Divers.....	6	66,7	83,3	66,7
<i>Total</i>	395	76,2	78,7	82,3

Il résulte de l'examen de ce tableau que, dans la syphilis primaire et secondaire, le T.P.C.F. est plus sensible que le T.P.I. Dans la syphilis nerveuse, comprenant paralysie générale et tabès, le T.P.I. est un peu plus sensible que le T.P.C.F. alors que dans la syphilis congénitale, ce dernier reprend l'avantage. Dans la syphilis latente et cardiovasculaire, les deux tests tréponémiques se montrent à peu près également sensibles. Sur les 395 sérums étudiés, le T.P.I. et le T.P.C.F. sont concordants dans 87,3 % des cas. La plupart des discordances viennent de la plus grande sensibilité du T.P.C.F. dans la syphilis récente.



Cette apparition plus précoce des anticorps T.P.C.F., de même que celle des réagines, au début de l'infection, par rapport aux immobilisines, peut être clairement démontrée par l'expérimentation sur le lapin. La

courbe de la page précédente présente la comparaison entre la vitesse d'apparition et l'évolution des trois anticorps chez le lapin inoculé avec le tréponème pâle.

D. Discussion.

L'emploi du désoxycholate pour l'extraction de *Treponema pallidum* fut suggéré par le travail de Schneider [153-154] qui isola ainsi un antigène fixant le complément, à partir de leptospires. Les fractions obtenues étaient non dialysables et contenaient du pentose. On observa ensuite que le constituant protéinique était peu réactif. La méthode de Portnoy et Magnuson, pour la préparation d'une fraction active sérologiquement à partir de *Treponema pallidum*, a donné de bons résultats, sans échec, dans neuf essais. Tous les lots d'antigène ont été de qualité égale du point de vue sérologique. Un poids moyen de 2,5 à 3 mg de poudre sèche de tréponèmes a été obtenue à partir de chaque lapin. Après extraction par le désoxycholate, la quantité d'antigène obtenue est suffisante pour au moins 50 réactions qualitatives, et l'extrait garde son activité sérologique pendant au moins 2 mois à — 20 °C. Il est probable que ces extraits donneront un produit satisfaisant par lyophilisation, bien que plusieurs essais utilisant cette méthode de conservation ont conduit à une légère perte de l'activité sérologique des antigènes.

La caractérisation chimique de l'antigène est encore obscure. On peut noter, toutefois, que tous les extraits antigéniques montrent à peu près la même quantité de protéines totales. La signification de la dose de phosphore n'est pas bien connue, mais on a constaté que des extraits semblables de testicules normaux contiennent une fois et demie autant de protéines que les extraits tréponémiques.

Apparemment, la substance réactive de l'extrait de *Treponema pallidum* n'est présente ni dans les tréponèmes *Reiter*, ni dans les testicules normaux, bien qu'un antigène actif sur les antisérums *Reiter* ait pu être préparé par la même méthode, à partir de tréponèmes *Reiter*. Ceci a un grand intérêt du fait que d'Alessandro et coll. ont préparé un antigène « protéinique » à partir de la souche *Reiter* qui réagit avec les sérums humains de syphilis et pian.

L'absorption d'un sérum syphilitique par un antigène cardioleucithinique montre clairement l'individualité des anticorps T.P.C.F. et réagines. De plus, un antisérum produit par injection à un lapin de précipité obtenu par interaction d'antigène V.D.R.L. et sérum syphilitique, se montra non réactif avec le T.P.C.F. bien que positif à la réaction de V.D.R.L. sur lame, à la dilution 1/64.

McLeod et Stokes [112] ont montré récemment la présence d'au moins deux anticorps agglutinants dans le sérum syphilitique. Un de ces anticorps a été identifié semblable à la réagine, tandis que l'autre reste non déterminé. Une relation serait possible entre l'anticorps T.P.C.F. et l'anticorps agglutinant autre que la réagine, d'après les résultats des tests d'inhibition.

Les tests d'inhibition ont montré que les anticorps T.P.I. et T.P.C.F. n'étaient pas identiques. De plus, les résultats obtenus dans la syphilis expérimentale du lapin ont montré que l'anticorps T.P.C.F. apparaît

très précocement, comme la réagine. Bien que ceci puisse n'être dû qu'à une différence de sensibilité dans les méthodes employées, T.P.I. et T.P.C.F. on observe, contre cette explication, que le pourcentage de positifs est moins grand avec le T.P.C.F. qu'avec le T.P.I. dans les syphilis latentes ou anciennes. L'action du chauffage à différentes températures indique une sensibilité égale des anticorps T.P.I., T.P.C.F. et réagine à la chaleur.

D'après les essais faits sur des sérums humains de malades connus, Garson et Portnoy [155] ont pu confirmer que l'anticorps T.P.C.F. est plus précoce que l'anticorps T.P.I. (confirmant les essais expérimentaux sur lapins) et que, par contre, on trouve moins de positifs de syphilis latente ou ancienne, comparativement aux résultats du T.P.I.

II. TECHNIQUE DE VAISMAN, HAMELIN ET PRUDHOMME [24-27-28]

A l'égal de ce que nous avons appliqué aux émulsions de spirochètes Reiter, nous avons soumis les tréponèmes virulents (souche Nichols) à l'action des ultra-sons dans les conditions suivantes :

A. Préparation de l'antigène ultrasoné.

La source de tréponèmes est fournie par des orchites jeunes de lapins infectés avec la souche Nichols. Les spirochètes sont mis en suspension dans l'eau physiologique phénolée à 0,3 % après plusieurs lavages afin d'éliminer le plus possible le suc testiculaire.

La désintégration est effectuée en soumettant la suspension de *Treponema pallidum* pendant 30 minutes à une fréquence de 960 kHz avec une puissance acoustique totale de 100 W dans une cloche cylindrique en verre dont le fond est formé d'une membrane de nitrocellulose (épaisseur : 0,03 mm) perméable aux ultra-sons. Pour éviter les actions oxydantes au cours de l'opération, les vibrations ultrasonores sont appliquées en atmosphère d'hydrogène.

L'antigène, ainsi préparé, se présente sous l'aspect d'une suspension légèrement opalescente et très homogène, constituée de fines granulations provenant des corps tréponémiques qui ont été entièrement désintégrés. Il est titré selon la technique de Boerner et Luckens, en vue d'une réaction de fixation du complément à froid, du type B.W. Kolmer.

B. Réaction proprement dite.

La réaction qualitative comporte deux tubes par sérum à examiner : l'un sera le tube réaction lui-même, l'autre le tube témoin sérum, sans antigène. Les titrages préliminaires de l'antigène et du complément du jour étant déjà effectués, le tableau XXVIII résume la technique de la réaction elle-même :

TABLEAU XXVIII

	Tube réaction	Tube témoin
Sérum suspect inactivé	0,05 ml	0,05 ml
Antigène tréponémique au 1/4	0,15 ml	—
Eau physiologique	—	0,15 ml
Complément dilué à 2 unités par millilitre...	0,3 ml	0,3 ml
<i>Fixation de dix-huit heures à + 6 °C.</i>		
<i>Réchauffer les tubes dix minutes à 37 °C.</i>		
Hématies de mouton à 2 %	0,15 ml	0,15 ml
Hémolysine antimouton diluée à 4 unités par millilitre.....	0,15 ml	0,15 ml
<i>Bain-marie à 37 °C jusqu'à hémolyse des tubes témoins.</i>		

De plus, il est indispensable de prévoir, pour chaque série de réactions :

- a) Un tube témoin antigène, qui doit hémolyser totalement (absence de pouvoir anticomplémentaire) ;
- b) Un témoin sérum négatif connu ;
- c) Un témoin sérum positif connu, utilisé à une dilution limite pour juger de la sensibilité de la réaction et de sa bonne reproductibilité.

C. Résultats.

Pour cette expérimentation, nous avons introduit intentionnellement une majorité de sérums de malades qui présentaient des dissociations entre le T.P.I. et la sérologie classique.

2 216 sérums humains ont été soumis comparativement à la sérologie classique lipidique (B.W. Kolmer et Demanche cardiopiline, Kline et Kahn), au test de Nelson, et aux réactions de fixation du complément avec les antigènes *Reiter* et *Treponema pallidum* ultrasonés.

ÉTUDE DE LA SENSIBILITÉ ET DE LA SPÉCIFICITÉ DE L'ANTIGÈNE *Treponema pallidum* ultrasoné

Sur les 2 216 sérums soumis à ces diverses réactions, nous avons constaté :

Une concordance de positivité dans les quatre méthodes pour 892 sérums et *une concordance de négativité* pour 473 sérums, soit 61,60 % ;
Des discordances pour 851 sérums, soit 38,40 % de la totalité des sérums examinés.

En prenant comme critère de sensibilité et de spécificité le test de Nelson, ces discordances se répartissent comme suit :

a) Sur les 774 sérums qui ont donné un T.P.I. positif, l'antigène *T. Pallidum* a été concordant dans 684 cas, le *Reiter* dans 582 cas et la sérologie classique dans 138 cas seulement.

Il en résulte que la sensibilité de l'antigène *T. pallidum* ultrasoné se rapproche plus de celle du T. P.I. que l'antigène *Reiter* ultrasoné et encore davantage que la sérologie classique.

b) Sur les 77 sérums à T.P.I. négatif, mais à sérologie classique positive, l'antigène *T. pallidum* s'est montré positif dans 24 cas seulement alors que l'antigène *Reiter* ultrasoné le fut 38 fois.

La spécificité de l'antigène *T. pallidum* ultrasoné est donc nettement supérieure à celle de l'antigène *Reiter* et permet d'éliminer davantage les réactions faussement positives de la sérologie classique.

Le tableau XXIX résume l'ensemble de ces résultats exprimés en pourcentage, tant pour la sensibilité que pour la spécificité de chaque méthode.

TABLEAU XXIX

MÉTHODES UTILISÉES	SENSIBILITÉ	SPÉCIFICITÉ
	Nombre de sérums positifs	Nombre de sérums négatifs
T.P.I.	1666 soit 100 %	550 soit 100 %
Ag. <i>T. pallidum</i>	1576 — 94,6 %	526 — 95,6 %
Ag. <i>Reiter</i>	1474 — 88,4 %	512 — 93,1 %
Sérologie lipidique	1030 — 61,8 %	473 — 86 %

Parmi tous les sérums étudiés, il nous semble qu'un certain nombre de « cas types » particulièrement intéressants méritent d'être brièvement exposés :

a) *Précocité de la réaction.* — Observation n° 51242.

Chancre avec ultra-positif — la prise de sang faite le même jour donne une sérologie classique et un T.P.I. complètement négatifs, alors que le B.W. avec l'antigène *T. pallidum* est déjà positif ainsi qu'avec l'antigène *Reiter*. La positivité est donc plus précocement décelable avec l'antigène *T. pallidum* qu'avec les réactifs lipidiques, ce que nous avons déjà observé avec l'antigène *Reiter*.

b) *Persistance plus longue de la positivité.* — Observation n° 51957.

Ancien spécifique à sérologie classique négative, suivi depuis quelques années et dont les T.P.I. sont passés par les taux suivants : 82 %, 87 %, 33 % puis sont devenus négatifs, avec 5 % et 2 %. La réaction avec l'antigène *T. pallidum* s'est révélée fortement positive. Il semblerait donc, dans ce cas, que ce dernier soit plus tardivement réductible encore que le T.P.I.

c) *Positivité plus précoce de la réaction dans les réinfections.* — Observation n° 50997.

Malade présentant une deuxième syphilis. Sérologie classique négative, mais T.P.I. positif à 78 %, ainsi que B.W. avec antigène *T. pallidum* et antigène *Reiter* fortement positifs. Dans la réinfection, les anticorps tréponémiques apparaissent plus précocement que les réagines, fait déjà prouvé pour le test de Nelson.

d) *Syphilis tertiaire négative à la sérologie classique (S.C.) et positive aux antigènes tréponémiques.* — Observation n° 50297.

Malade présentant une gomme syphilitique et dont la sérologie classique est négative, alors que le T.P.I. est à 100 % et le B.W. antigène *T. pallidum* positif ++.

e) *Syphilis nerveuse négative à la S.C. et positive aux antigènes tréponémiques.* — Observation n° 50343.

Tabès. Sérologie classique négative, T.P.I. à 82 %, antigène *T. pallidum* positif +++.

f) *Réaction faussement positive à la S.C.* — Observation n° 50 224.

Malade présentant, en octobre 1957, une sérologie lipidique faiblement positive à la suite d'un chancre mou. Le 25 novembre, la sérologie classique est au même degré de positivité, mais le T.P.I. est négatif ainsi que la réaction avec l'antigène *T. pallidum*.

g) *Réaction faussement positive à la S.C. et avec l'antigène Reiter.* — Observation n° 49947.

Malade présentant une sérologie classique positive sans antécédents spécifiques et un T.P.I. négatif, vérifié à plusieurs reprises au cours d'une année. L'antigène *T. pallidum* concorde avec la négativité du test de Nelson, alors qu'ici, l'antigène *Reiter* suit la sérologie classique avec une positivité à ++++. L'antigène *T. pallidum* semble donc plus spécifique que l'antigène *Reiter*, en accord avec le T.P.I.

D. Discussion.

La sérologie classique, utilisant les antigènes lipidiques, est capable de révéler dans les sérums la présence des *réagines*, seulement — et l'on ne peut pas encore déterminer les rapports exacts qui relient cette réagine à *Treponema pallidum*.

L'antigène tréponémique *Reiter* permet de mettre en évidence non seulement ces réagines, mais également des anticorps différents. Après les expériences contradictoires de Gaeltgens, Klopstock, Beck, Eagle et Hogan, l'école italienne réussit à isoler de la culture du *Reiter* trois antigènes distincts, un lipidique assimilable aux extraits organiques utilisés pour la sérologie classique, un autre de nature polysaccharidique thermostable et, un troisième, protidique, thermolabile et, selon les auteurs, seule fraction spécifique.

Cependant, on ne peut conclure à une similitude antigénique entre le *Reiter* et l'agent pathogène de la syphilis. En effet, sur le plan expérimental, il est démontré que l'inoculation au lapin :

a) De l'haptène lipidique associé à une protéine (ex. extrait de cœur de bœuf avec sérum de porc) détermine la seule apparition d'*anticorps de Wassermann* (réagine) ;

b) De *tréponèmes Reiter* déclenche la formation et de *réagine* et d'*anticorps Reiter*.

c) De *Treponema pallidum* entraîne la production des trois anticorps, à savoir : *réagine*, *anti-Reiter*, et *anti-T. pallidum* (immobilisines).

Ces différences antigéniques entre le tréponème pâle et le tréponème Reiter sont un argument de plus en faveur de l'utilisation de l'antigène *Treponema pallidum* ultrasoné.

En conclusion, l'antigène obtenu par la désintégration de *Treponema pallidum* au moyen des ultra-sons, employé en réaction de fixation du complément, présente un grand intérêt pour le séro-diagnostic de la syphilis du fait de sa plus grande sensibilité et spécificité sur les antigènes lipidiques et même spirochéliens de souche Reiter, se rapprochant davantage des résultats fournis par le test d'immobilisation du tréponème.

III. TECHNIQUE DE ORPWOOD PRICE ET WHELAN [136]

Ces auteurs ont préparé également un antigène à partir de *T. pallidum* pathogène, consistant en un broyat de corps spirochéliens. Cette technique de préparation est relativement simple et ils procèdent de la manière suivante :

A. Préparation de l'antigène.

Les testicules d'un lapin, infecté depuis 5 à 10 jours, et présentant une orchite jeune, sont prélevés aseptiquement, coupés et mis dans 40 ml d'eau physiologique contenant 0,1 % de nitrure de sodium comme antiseptique. L'extraction des tréponèmes est faite en soumettant la suspension à une agitation de 1 heure sur un agitateur de Kahn (280 oscillations par minute). Le liquide surnageant est décanté et on procède de nouveau à deux extractions semblables. Les trois liquides d'extraction sont réunis, soumis à un chauffage à 60 °C pendant 1 heure, puis centrifugés à 1 500 t/mn pendant 10 minutes pour éliminer les gros débris tissulaires. Le liquide surnageant, contenant les tréponèmes, est alors centrifugé à 4 000 t/mn pendant 1 heure, pour sédimenter les spirochètes qui forment un petit dépôt bien ferme au fond du tube. Le liquide surnageant est décanté et le culot est repris par 20 ml d'eau physiologique nitrée. Après homogénéisation, nouvelle centrifugation à 4 000 t/mn, et ce lavage des corps spirochéliens est répété trois fois. Le culot est repris alors avec 5 ml seulement d'eau physiologique nitrée et transféré ensuite dans un flacon stérile de 25 ml. On ajoute dans ce flacon du verre pilé en quantité suffisante pour couvrir le fond du flacon sur une hauteur d'environ 3 mm et on place le flacon pendant 1 heure sur l'agitateur de Kahn. A ce moment, on devra s'assurer, par contrôle à l'ultramicroscope de la suspension, que les corps spirochéliens ont été bien hachés et, dans l'affirmative, le liquide est décanté et constitue l'antigène.

Il se conserve à + 4 °C et garde son activité sérologique pendant 6 mois et même plus. Chaque lapin fournit en général assez de tréponèmes pour obtenir en moyenne, 3 à 5 ml d'antigène. Sa dilution optima est déterminée par titrage et se situe presque toujours au 1/6 ; l'antigène fourni par un lapin permet de faire entre 900 et 1 400 réactions qualitatives, selon la technique de fixation du complément de Price.

B. Résultats.

Les auteurs ont examiné 3 279 sérums humains comparativement avec la sérologie lipidique (réaction standard de Price) et leur antigène tréponémique.

Pour un certain nombre, ils ont pratiqué également le test d'immobilisation.

Leurs résultats montrent que, utilisant la même technique d'hémolyse, l'antigène tréponémique est plus sensible que l'antigène lipidique, et que la sensibilité et la spécificité du premier égalent celles du T.P.I. Les auteurs insistent sur les avantages de leur antigène par rapport à celui de Portnoy et Magnuson auquel ils reprochent la préparation difficile et longue, la stabilité limitée à 2 mois à condition de le conserver à -20°C , et enfin, le rendement faible en volume.

IV. TECHNIQUE DE DARDANONI ET CENSUALES [157]

Dardanoni et Censuales ont extrait du tréponème pâle virulent une fraction protéinique, non pas dans le but de se servir de cette fraction comme antigène pour le séro-diagnostic de la syphilis, mais beaucoup plus pour la comparer à la fraction extraite dans les mêmes conditions, à partir du tréponème de culture Reiter, et afin de démontrer par des essais d'absorption, l'existence d'un antigène commun à ces deux souches de tréponèmes.

A. Préparation de l'antigène protéique de *T. pallidum*.

Ils préparent une suspension de tréponèmes pâles (souche Nichols) en lavant des testicules de lapin infectés depuis 7 à 9 jours, avec une solution citratée. Cette suspension est centrifugée une première fois à faible vitesse, pour éliminer les gros débris tissulaires, les hématies et spermatozoïdes, une deuxième fois à grande vitesse pour sédimenter les tréponèmes. Ceux-ci sont repris par de l'eau physiologique, lavés trois fois, puis remis en suspension dans une quantité donnée d'eau physiologique pour obtenir une concentration de 5.10^8 par ml. On conserve cette suspension à -20°C jusqu'au moment où l'on désintègre les spirochètes par cryolyse, c'est-à-dire congélation à -76°C et décongélation à 37°C alternativement quinze fois consécutives. La suspension cryolysée est centrifugée à 8 000 t/mn pendant 90 minutes. Le liquide surnageant est décanté et le sédiment, repris par 5 ml d'eau physiologique est de nouveau soumis à la cryolyse dans les mêmes conditions que précédemment. Les liquides surnageants sont réunis, placés dans un sac de cellophane pour être dialysés contre des solutions de sulfate d'ammonium en concentrations croissantes, soit 10, 20, 30, 50 et 75 % de saturation. Un précipité apparaît dans le sac de cellophane, que l'on recueille par centrifugation, redissout dans une solution tampon isotonique phosphatée. La solution, légèrement opalescente, est de nouveau dialysée contre le même solvant jusqu'à l'élimination complète des ions SO_4 . Après une dernière centrifugation légère pour éliminer éventuellement des particules

insolubles, le liquide surnageant est récolté et constitue l'antigène protéique du tréponème pâle. Il se conserve parfaitement bien pendant plusieurs mois à $+ 4^{\circ}\text{C}$, en gardant la totalité de sa réactivité.

B. Résultats.

Cet antigène, en technique de fixation du complément, réagit positivement avec les sérums humains spécifiques et les sérums de lapins syphilitisés, et à un moindre degré, avec des sérums anti-Reiter, préparés par traitement de lapins avec l'antigène protéique Reiter.

Des essais d'absorptions croisées de sérums humains syphilitiques ont montré que l'antigène protéique des tréponèmes virulents était capable d'absorber les anticorps réagissant avec lui-même et également ceux réagissant avec l'antigène protéique Reiter, tandis que ce dernier absorbe seulement les anticorps homologues. Les auteurs en concluent que le tréponème pâle virulent et le tréponème de culture Reiter portent un antigène commun.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Nous venons de passer en revue les différentes techniques proposées pour la préparation d'un antigène à partir de *Treponema pallidum* pathogène. Il semble bien, d'après les essais obtenus jusqu'à ce jour, que ces différentes préparations aient à peu près la même valeur antigénique et que les résultats obtenus avec celles-ci se rapprochent le plus de ceux du test d'immobilisation, en montrant une nette supériorité sur les antigènes *Reiter*.

L'antigène de Portnoy et Magnuson, extrait au désoxycholate de sodium, est de préparation longue et délicate, d'une stabilité limitée à deux mois à condition de le conserver à -20°C , et enfin d'un faible rendement.

L'antigène de Price et Whelan, consistant en une émulsion de tréponèmes chauffés et broyés avec du verre pilé, est plus facile à préparer et de bonne conservation.

La préparation de Dardanoni et Censuales est d'une technique difficile; nous n'avons aucun renseignement sur le rendement et sa conservation. Quant à sa valeur sérologique et pratique, elle a été très peu étudiée.

L'antigène que nous préparons dans notre laboratoire, consistant à soumettre tout simplement une suspension de *Treponema pallidum* pathogène à la désintégration ultrasonique, est d'une très bonne conservation à $+ 4^{\circ}\text{C}$ (un lot, préparé il y a deux ans, a gardé la même activité). Cet antigène, testé sur plusieurs milliers de sérums, nous a fourni d'excellents résultats, très voisins de ceux du T.P.I.

CHAPITRE VIII

LES TESTS CUTANÉS DANS LE DIAGNOSTIC DE LA SYPHILIS LUO-TEST

HISTORIQUE.

Avec la période tertiaire de la syphilis on observe, chez l'homme, un changement très net dans la réponse de l'individu à l'intradermo-réaction de tréponèmes tués. Dans la période primo-secondaire, bien que les lésions contiennent un très grand nombre d'organismes, il n'y a pas de destruction de tissu et les lésions guérissent sans laisser de cicatrices ni d'atrophies. Avec l'arrivée de la période tertiaire, des lésions nécrosées apparaissent, contenant un petit nombre de spirochètes. Ce changement dans le type de réaction peut être appelé une véritable « allergie » dans le sens propre du mot utilisé par von Pirquet, signifiant un changement dans la réactivité de l'organisme infecté. La positivité des tests cutanés effectués avec des suspensions ou extraits de tréponèmes (luétine) dans cette période tertiaire montre qu'il s'agit véritablement d'un état allergique, alors que, dans les périodes primaires et secondaires, ils se révèlent toujours négatifs (périodes anallergiques).

C'est Jadassohn [158] qui, dès 1907, essaya le premier les tests cutanés pour le diagnostic de la syphilis. Faute de cultures de tréponèmes, il utilisait un extrait de foie de fœtus hérédosyphilitique, antigène qu'utilisait Wassermann pour le séro-diagnostic. Par la suite, on essaya d'utiliser des tréponèmes de culture (non pathogène), puis des extraits d'organes d'animaux syphilités, et enfin, des suspensions purifiées de *Treponema pallidum* pathogènes tués.

Nous nous proposons de résumer les différentes étapes de l'évolution des tests cutanés dans la syphilis.

I. ANTIGÈNES PRÉPARÉS A PARTIR DE FŒTUS HÉRÉDOSYPHILITIQUES OU DE LÉSIONS DE SYPHILIS ACQUISE

Nous venons de citer *Jadassohn*, qui fut l'initiateur de la méthode, mais son expérimentation fut très brève et ses résultats peu concluants. En 1908, *Tedeschi* [159] utilise un extrait aqueux de chancre syphi-

litique, et pratique, avec cet antigène, des cuti-réactions et ophtalmo-réactions. Ces dernières furent toujours négatives et l'auteur n'obtint qu'une seule cuti positive. D'autres auteurs, tels *Ciuffo* [160], *Nobl et Fluss* [161], n'observèrent que des échecs. *Neisser et Bruck* [162], en 1909, comparèrent les deux antigènes, l'extrait de foie d'hérédosyphilitique et l'extrait de chancre, mais les résultats qu'ils obtinrent furent discordants. De plus, ils constatèrent des cuti-réactions positives avec des extraits de foie sain et donnèrent à cet état réactionnel particulier du syphilitique le nom de « Umstimmung ». Cependant, cette même année, *Meirowsky* [163], en utilisant comme antigène un extrait aqueux de foie de fœtus syphilitique, obtint, en cuti-réaction, des résultats très intéressants. Statistiquement, il observa 96 % de cuti-réactions positives chez des sujets syphilitiques contre 1 % seulement chez les témoins.

En 1910, l'Ecole lyonnaise, avec *Charlet, Gauthier, Nicolas et Favre* [164], prépara un antigène qui était un extrait glyciné de foie de fœtus syphilitique, qu'ils dénommèrent « syphiline ». Ils pratiquaient à la fois des cuti-réactions et des intradermo-réactions, mais les premières leur donnèrent des réponses constamment négatives. Par contre, les intradermo-réactions étaient positives dans la majorité des cas chez les sujets syphilitiques et invariablement négatives chez les témoins. A eux revient le mérite d'avoir signalé certains points capitaux tels l'importance de la spécificité de l'antigène utilisé, les discordances fréquentes entre les réactions cutanées et les réactions sérologiques qui ne mettent pas en jeu les mêmes réponses organiques, et enfin la positivité maxima des réactions cutanées au cours des syphilis tertiaires seléro-gommeuses.

A la suite des travaux de l'Ecole lyonnaise, nombre d'auteurs confirmèrent ces résultats, tels *Fontana* [165], en 1911, et *Gavini* [166], en 1912, en Italie.

En 1913, *Fischer et Klaussner* [169], en Autriche, préparèrent un nouvel antigène, connu sous le nom de « phalline », à partir de la pneumonie blanche du fœtus. Ce produit donnait des résultats positifs dans les syphilis tertiaires et congénitales, négatifs dans les syphilis primo-secondaires et les autres maladies cutanées.

II. ANTIGÈNES PRÉPARÉS A PARTIR DE SPIROCHÈTES DE CULTURE

Schereschewsky [168] avait, en 1909, tenté des cuti-réactions avec des spirochètes de culture, dénués de virulence. Mais c'est surtout *Noguchi* [169-170] qui, en 1911, prépara un antigène pour tests cutanés, qui n'était autre qu'une culture de spirochètes chauffée et additionnée d'acide phénique et qu'il appela « luétine ». Les essais cliniques portant sur plusieurs milliers de cas montrèrent que si l'antigène donnait des résultats positifs en nombre plus ou moins grand selon l'évolution de l'infection syphilitique, un pourcentage important de sujets sains réagissaient également, pourcentage pouvant atteindre 30 %.

Récemment, nous avons repris [25] les intradermo-réactions avec

le tréponème de culture Reiter et des fractions purifiées isolées de ce spirochète. Les résultats furent constamment négatifs chez les syphilitiques quelle que soit la phase de l'infection. Par contre, chez le lapin, aussi bien syphilitisé expérimentalement qu'immunisé vis-à-vis du *Reiter*, les réponses des tests cutanés à l'antigène *Reiter* furent positives. Cependant, chose curieuse, cet animal ne répond pas à l'intradermo-réaction avec des antigènes de tréponèmes pâles pathogènes (luétine).

III. ANTIGÈNE PURIFIÉ PRÉPARÉ A PARTIR DE TREPONEMA PALLIDUM PATHOGÈNE (LUÉTINE)

Dans les paragraphes précédents nous avons vu que les antigènes pour tests cutanés d'origine humaine donnaient des résultats irréguliers. Ceci était probablement dû aux extraits tissulaires qui accompagnaient les tréponèmes. D'autre part, les tréponèmes de culture fournissent des antigènes peu spécifiques avec des résultats inconstants. Il était donc nécessaire de réaliser des suspensions de tréponèmes pâles, débarrassés autant que possible de toute trace d'extrait d'organe. C'est *Muller et Brandt* qui, en 1927, les premiers, réalisèrent une telle préparation en extrayant les tréponèmes des testicules de lapin syphilitisé expérimentalement. Cet antigène, appelé *luétine*, nom déjà utilisé par *Noguchi* pour les préparations avec les tréponèmes de culture, se montre d'une grande spécificité et d'une bonne sensibilité dans certaine forme de la syphilis. L'usage de cette réaction, dénommée *luo-test* fut introduit en France par *Degos* [171]. Ces dernières années, grâce à la facilité d'obtention d'orchites précoces, la préparation d'une luétine purifiée est devenue très facile et le *luo-test* est passé dans l'usage courant.

A. Préparation de la luétine purifiée.

La technique suivante est celle que nous utilisons pour préparer la luétine purifiée. Des lapins sont inoculés avec la souche *Nichols* pathogène de tréponèmes, par voie intratesticulaire et, dès l'apparition de l'orchite, les testicules sont prélevés aseptiquement, coupés en tranches minces et chacun d'eux placé dans un Erlenmeyer stérile contenant 10 ml d'eau physiologique. Les flacons sont placés sur un agitateur de *Kahn* et agités pendant une heure de manière à provoquer la diffusion des tréponèmes dans le milieu liquide. Après décantation, les morceaux de tissus sont soumis à une deuxième extraction dans les mêmes conditions et les liquides sont réunis. L'émulsion brute ainsi obtenue contient environ 20 à 50 tréponèmes par champ à l'ultramicroscope selon la richesse de l'orchite. On la centrifuge pendant 10 minutes à 3 000 t/mn afin d'éliminer les hématies, les spermatozoïdes et les débris tissulaires divers. Après décantation, le liquide surnageant est additionné de formol neutre en quantité suffisante pour obtenir une concentration finale de 1 °/oo, et la suspension ainsi formolée est gardée pendant 48 heures à 37 °C afin

de tuer les tréponèmes. On soumet alors l'émulsion à deux centrifugations de une heure à 8 000 t/mn pour sédimenter les tréponèmes, repris à chaque fois par de l'eau physiologique. Ce lavage a pour but d'éliminer les impuretés en solution et les traces de sucs testiculaires. Après la dernière centrifugation, le culot de tréponèmes est repris définitivement avec de l'eau physiologique formolée à 0,5 ‰, en quantité suffisante pour obtenir une concentration d'environ 100 000 tréponèmes par millimètre cube. Après un contrôle de stérilité de l'antigène terminé, il est distribué en ampoule par fraction de 0,5 ml et gardé à $+ 4^{\circ}\text{C}$. Son activité est vérifiée en le comparant avec un ancien lot de luétine qui a donné des résultats satisfaisants et que l'on peut considérer comme antigène de référence. Pour cela, quelques sujets humains sains et spécifiques avérés, en phase tertiaire ou latente, subissent une intradermo-réaction avec d'une part l'antigène à vérifier et d'autre part la luétine de référence, les résultats devant être identiques avec les deux préparations.

La luétine purifiée se conserve parfaitement bien et garde sa réactivité pendant plusieurs années.

B. Technique du *luo-test*.

Le *luo-test* consiste en une intradermo-réaction pratiquée dans la région deltoïdienne par injection de 0,1 ml de *luétine*.

Une réaction positive se présente, au point d'injection, comme une papule érythémateuse, de 3 à 6 mm de diamètre, souvent entourée d'une aréole érythémateuse. La réaction est déjà visible après 24 heures, mais atteint son maximum d'intensité vers le 3^e ou 4^e jour. L'infiltration qui l'accompagne toujours déborde largement la papule et persiste pendant 2 à 3 semaines.

Une réaction négative ne donne, soit aucune réponse visible au point d'injection, soit dans certains cas un érythème apparaissant rapidement et disparaissant en 3 ou 4 jours au maximum, sans aucune infiltration, l'absence de celle-ci étant encore le meilleur signe de différenciation d'avec une réponse positive. On peut d'ailleurs pratiquer, en même temps, une deuxième intradermo-réaction avec un antigène témoin préparé à partir de testicules normaux de lapins formolés à 0,5 ‰ ou bien avec une protéine quelconque, sérum de cheval, etc. Chez les sujets sensibilisés aux protéines, on constate avec cette intradermo-réaction témoin, la même réaction érythémateuse précoce et fugace, mais sans infiltration. Nous reviendrons d'ailleurs dans la discussion de l'interprétation du *luo-test*, sur la sensibilisation aux protéines chez les syphilitiques.

C. Résultats.

Le *luo-test* se montre d'une excellente spécificité puisque aucun des auteurs qui ont utilisé les préparations purifiées de luétine n'ont obtenu de résultats positifs en dehors de la syphilis.

Chez les spécifiques, la positivité est fonction de la phase de l'infection, c'est-à-dire de l'état allergique ou anallergique du sujet.

Le tableau XXX donne les pourcentages de réactions positives obtenues au cours de l'évolution de la syphilis :

TABLEAU XXX

PHASES DE L'INFECTION	% DE POSITIFS
Syphilis primo-secondaire (phase anallergique)	0
Syphilis tertiaire (phase allergique)	100
Syphilis cardiovasculaire	100
Syphilis congénitale	100
Syphilis nerveuse	50 à 60
Syphilis sérologique	50 à 60

Le tableau XXX montre tout l'intérêt que l'on peut tirer de cette réaction. Elle est en effet positive dans les phases de la maladie où le diagnostic clinique est le plus souvent difficile à poser et où la sérologie classique est fréquemment négative à tort. Dans les syphilis sérologiques (sans manifestation ni antécédent connus), le luo-test peut indiquer l'âge de l'infection car, si l'intradermo-réaction est négative, on peut supposer que la contamination est relativement récente ; au contraire, dans les infections anciennes, le test est toujours positif.

DISCUSSION

Nous venons de voir que dans la phase primo-secondaire de la syphilis, le luo-test fournit toujours des résultats négatifs. En effet, il est admis que la syphilis récente est anallergique et ses lésions, qui sont la réponse de l'organisme à l'envahissement microbien, sont peu importantes par rapport au grand nombre de tréponèmes qu'elles contiennent. Au contraire, les lésions tertiaires, malgré leur grande étendue, ne contiennent que très peu de tréponèmes, ce qui démontre, qu'à ce stade, l'organisme répond violemment par des réactions tissulaires intenses. Ce changement de réactivité de l'organisme correspond à l'établissement de l'état allergique dont la conséquence est la positivation du luo-test.

Cependant, un phénomène curieux a été signalé récemment par Charpy [172]. Ce dernier affirme que si, dans la syphilis primo-secondaire, le luo-test est négatif, ce n'est pas parce que le malade est en phase anallergique, mais parce que son allergie est masquée. Charpy pratique une première intradermo-réaction dont le résultat est évidemment négatif. Mais, en répétant l'injection, de préférence au même endroit, à 15 ou 30 jours d'intervalle, il obtient un résultat positif. Bien entendu, chez les sujets témoins, la répétition de l'intradermo-réaction n'entraîne pas de positivité comme chez le spécifique.

Nous avons signalé dans la technique du test que certains auteurs préconisaient la pratique d'une intradermo-témoin, avec une protéine quelconque. Le syphilitique possède, dans certains cas, un état d'hyper-sensibilité cutanée non spécifique (hétéro-allergie) que l'on peut mettre en évidence par des substances protidiques des plus diverses. Mais, en réalité, nous avons vu que la réponse à une injection autre que celle de luétine se manifeste seulement par une réaction précoce, érythème d'apparition rapide et fugace, et on ne trouve jamais cette infiltration profonde et durable que l'on constate après l'injection de luétine chez les vieux syphilitiques.

CONCLUSION

Le luo-test présente donc un intérêt théorique certain, mais surtout pratique. Il permet d'établir un diagnostic de syphilis dans certains cas cliniques difficiles, à sérologie classique en défaut, et aussi d'éliminer la syphilis dans des cas douteux. Sa valeur est grande à condition de la pratiquer avec un bon antigène et de bien observer l'évolution de la réponse cutanée, en ayant présent à la mémoire que seule compte comme témoin de positivité, une réaction érythémateuse nette et durable et surtout toujours accompagnée d'une infiltration importante persistant pendant 2 à 3 semaines.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Les antigènes tréponémiques utilisés pour le séro-diagnostic de la syphilis constituent une vaste question que de récents progrès ont rendu plus intéressante encore. Pour notre part, depuis huit ans, nous nous sommes attachés à l'étude de ce problème, tant au point de vue pratique qu'expérimental, en ayant comme but de combler un certain nombre de lacunes, ce que nous pensons avoir atteint dans une certaine mesure. La présente thèse est une mise au point aussi complète que possible de cette question dans laquelle sont incorporées nos recherches personnelles.

Pour faciliter l'exposé de ce travail, nous l'avons divisé en deux parties :

La première a trait au test d'immobilisation des tréponèmes seul. Une brève historique rappelle l'évolution de la sérologie de la syphilis depuis les recherches de Wassermann, Neisser et Bruck (1906) jusqu'aux travaux de Nelson et Mayer (1949), travaux qui ouvrirent la voie à de nouvelles expérimentations.

Nous exposons, dans le *premier chapitre*, le principe et la technique détaillée de la réaction de Nelson et Mayer, telle que nous la pratiquons dans notre laboratoire de l'Institut Alfred Fournier. D'autre part, dans ce même chapitre, nous étudions le rôle des divers éléments qui entrent dans la réaction ainsi que les différentes variantes qui ont été proposées.

Le *second chapitre* concerne l'étude expérimentale de la réaction. Nous décrivons les diverses propriétés de l'anticorps immobilisant le tréponème :

- Sa différenciation d'avec la réagine syphilitique et les autres immobilisines spirochéliennes, différenciation que nous avons clairement mise en évidence par notre méthode de séparation par ultracentrifugation ;
- Son pouvoir tréponémicide ;
- Sa nature, son mode de production et sa localisation dans les fractionnements protéiques.

La cinétique de la réaction est étudiée en fonction du temps, de la température d'incubation et de la concentration en alexine, et nous exposons les divers moyens permettant de prévenir la sensibilisation de tréponèmes chez le lapin, au cours de développement de l'orchite spécifique.

Dans le *troisième chapitre*, nous étudions le test d'immobilisation dans la syphilis expérimentale, en particulier chez les divers animaux réceptifs (lapin, souris, rat, cobaye, hamster) et son évolution sous l'action de traitements spécifiques, bismuth, pénicilline et association pénicilline-bismuth. Toutefois, une importante partie de ce troisième chapitre est

consacrée à l'interprétation clinique qu'il convient de donner au test de Nelson.

Notre expérience acquise au cours de huit années de pratique et qui porte sur plus de 78 000 examens nous permet d'apporter les conclusions suivantes : le test de Nelson est plus sensible que les réactions sérologiques courantes et sa positivité persiste plus longtemps ; il peut d'ailleurs demeurer le seul test positif alors que le séro-diagnostic lipidique est devenu négatif. Signalons toutefois que, dans la syphilis primaire, l'apparition des immobilisines est plus tardive que celle des réagines. La diminution du taux des anticorps immobilisants plaide en faveur d'une évolution de la maladie vers la guérison. Le test est, de ce fait, la mesure la plus sensible au point de vue du contrôle des effets du traitement et pourrait, dans certaines conditions, constituer un indice de guérison. La persistance d'un test positif, chez un syphilitique récent, et à plus forte raison, une reprise de la positivité suggèrent l'idée que la maladie n'a pas été jugulée et qu'il y a lieu de reprendre un traitement plus énergique. Cependant, dans les syphilis anciennes, la persistance des immobilisines (coïncidant ou non avec un B.W. irréductible) ne signifie pas, d'une manière absolue, la coexistence d'une tréponème en activité. Il y a lieu d'admettre, en effet, qu'à l'exemple de ce qui se passe dans d'autres maladies infectieuses, l'organisme peut continuer à élaborer des immobilisines après l'épuisement du facteur antigénique. Par ailleurs, il est démontré que certains états morbides autres que la syphilis, confèrent aux sérums des propriétés nouvelles se traduisant par des réactions classiques *faussement positives*. La présence ou l'absence d'immobilisines tranche le problème et permet d'affirmer si une réaction est ou non *fausse*. Le test de Nelson se révèle donc d'une *spécificité* rigoureuse et d'une sensibilité très supérieure à celles des réactions classiques. Il peut, de ce fait, être considéré comme le meilleur élément que le laboratoire peut apporter au clinicien pour éclairer les problèmes si complexes que pose parfois l'infection syphilitique.

La deuxième partie de cet ouvrage traite des autres réactions utilisant les antigènes tréponémiques. Si quelques-unes d'entre elles sont antérieures au test de Nelson quant à leur mise en évidence et expérimentation (réactions d'agglutination des tréponèmes pâles et réactions de fixation du complément avec l'antigène Reiter), elles subirent un regain d'intérêt grâce à celui-ci, qui servit de critère de sensibilité et de spécificité pour juger de leur valeur.

La réaction d'adhérence-disparition des tréponèmes (dite encore : réaction d'immune-adhérence) constitue le *quatrième chapitre*. Due aux travaux de Nelson, en 1950, elle consiste à mettre en présence le sérum suspect avec une suspension antigénique de tréponèmes tués, du complément et des hématies humaines lavées de groupe O. Si le sérum contient l'anticorps spécifique, ce dernier sensibilise les tréponèmes qui, sous l'action du complément, viennent adhérer aux hématies. La lecture de la réaction consiste à évaluer, après sédimentation des globules rouges, le pourcentage de disparition des tréponèmes dans le liquide surnageant.

Cette réaction offre, sur le T.P.I., certains avantages : emploi d'un antigène conservable puisqu'il s'agit de tréponèmes tués, rapidité d'exé-

cution ne nécessitant pas de précautions de stérilité dans ses manipulations, et spécificité quasi superposable à celle du test de Nelson quoique l'anticorps qui entre en jeu soit différent de l'immobilisine. Mais deux inconvénients majeurs font qu'elle reste peu pratiquée. Ils tiennent dans les variations individuelles des lots d'antigènes, pas toujours explicables, et surtout dans la difficulté de lecture consistant à dénombrer les tréponèmes disparus.

Dans le *cinquième chapitre*, nous décrivons les diverses techniques d'agglutination des tréponèmes actuellement proposées (Tani, Cain, McLeod et Magnuson, Hardy et Nell). Leur simplicité de principe et d'exécution en ferait une technique de choix si de sérieux inconvénients ne venaient leur enlever une partie de leur valeur. La reproductibilité des suspensions antigéniques tréponémiques est en effet très inconstante d'où des résultats variables avec ceux-ci. De plus, les anticorps agglutinants diffèrent de l'immobilisine, semblent répartis sur plusieurs fractions de la globuline sérique et l'anticorps antilipide, autrement dit *réagine*, participe au phénomène d'agglutination pouvant ainsi amener des réactions faussement positives. La spécificité du test peut cependant être améliorée après élimination de la réagine par adsorption, mais cette longue préparation préliminaire des sérums empêche l'utilisation des réactions d'agglutination en pratique quotidienne.

Plus important est le *sixième chapitre* consacré à l'étude des antigènes tréponémiques de la souche cultivable Reiter. Commencées en 1929 par Gaeltgens, les investigations se sont poursuivies au cours des années suivantes et nous avons relaté les importants travaux d'Alessandro à ce sujet. Mais, dans le but de mettre au point une réaction se rapprochant davantage du test de Nelson du point de vue sensibilité et spécificité, et plus facilement réalisable par la majorité des laboratoires, l'intérêt des sérologistes se tourna de nouveau vers les cultures de tréponèmes. Nous avons cherché nous-même à préparer un antigène plus sensible et surtout facilement utilisable en réaction de fixation du complément, antigène que l'emploi de la désintégration ultrasonique nous permet d'obtenir. En prenant comme base le test de Nelson, nos statistiques personnelles ont montré avec l'antigène Reiter un manque de sensibilité dans 4,90 % des sérums alors que la sérologie classique a été en défaut dans 9,40 % des cas ; au point de vue spécificité, toujours par rapport au T.P.I., le Reiter donna seulement 2,70 % de réactions faussement positives, pour 6,65 % enregistrés avec la sérologie lipidique.

L'antigène Reiter apporte donc un progrès incontestable dans le séro-diagnostic de la syphilis, mais n'atteint cependant pas la valeur du test de Nelson. Nous complétons ce chapitre par une étude expérimentale importante.

Nous avons montré que l'anticorps anti-Reiter était le premier à apparaître dans le sang au début de l'infection syphilitique, avant la réagine et bien avant les immobilisines de Nelson, que l'injection au lapin de tréponèmes Reiter déclenchait la production d'un anticorps anti-Reiter décelable par l'antigène homologue, mais nullement immobilisant pour *Treponema pallidum* virulent, ce qui doit mettre en garde contre la trop facile identité antigénique que l'on prête volontiers à ces deux spirochètes.

Après une étude sur le fractionnement antigénique des tréponèmes Reiter, nous avons essayé de mettre en évidence, chez le lapin syphilitisé ou préparé avec l'antigène Reiter, ou chez l'homme syphilitique, un état de sensibilisation allergique avec une suspension de spirochètes ou la fraction protidique purifiée de l'antigène. Si les tests cutanés donnent, dans certaines conditions des réponses positives dans la syphilis expérimentale du lapin, les résultats obtenus chez l'homme furent régulièrement négatifs.

Les résultats favorables obtenus avec l'antigène Reiter du point de vue de séro-diagnostic de la syphilis incitèrent un certain nombre d'auteurs à la recherche d'un antigène similaire mais préparé avec des tréponèmes pâles pathogènes, véritable agent de cette infection. L'exposé des diverses méthodes proposées font l'objet de notre *septième chapitre*. Nous rapportons les travaux de Portnoy et Magnuson qui obtinrent, par action du désoxycholate de sodium sur *Treponema pallidum* délipidé, un extrait antigénique donnant des résultats très voisins de ceux du T.P.I., mais de conservation difficile.

Comme nous l'avions fait pour le tréponème Reiter, nous avons également appliqué la désintégration ultrasonique au tréponème pâle et ce procédé nous a permis d'obtenir un antigène offrant une spécificité et une sensibilité beaucoup plus rigoureuses que celles du Reiter ; c'est à l'heure actuelle, le test qui se rapproche le plus du T.P.I. Notre antigène ultrasoné a l'avantage d'une conservation pratiquement illimitée à + 4 °C et d'une utilisation facile par technique de fixation du complément à froid. La précocité de la réaction au début de l'infection, et dans les réinfections, sa positivité plus tenace au cours du traitement de la syphilis, en font une technique intéressante à tout point de vue. De plus, elle satisfait davantage du point de vue immunologique puisqu'il s'agit d'une véritable réaction antigène-anticorps. Nous passons en revue également les essais de Price et Whelan, et de Dardanoni et Censuales, se rapportant toujours à la préparation d'antigènes à partir du tréponème pâle pathogène.

Nous ne pouvons conclure l'ensemble de ce sujet sans parler des tests cutanés pratiqués pour le diagnostic de la syphilis (luo-tests), qui utilisent également un antigène tréponémique, la luétine. Après avoir refait l'historique de cette cuti-réaction, nous exposons la préparation de la luétine purifiée et surtout les résultats qu'elle permet d'obtenir chez l'homme. Toujours négatif dans la phase primo-secondaire de la syphilis (phase anallergique), le luo-test est positif dans 100 % des cas au cours de la syphilis tertiaire, cardiovasculaire et congénitale (phases allergiques) et dans 50 à 60 % des cas de syphilis nerveuse ou sérologique asymptomatique. Quoiqu'il ne s'agisse pas d'un séro-diagnostic, nous pensons que ce test de sensibilisation allergique, du fait qu'il utilise comme antigène le tréponème, peut rentrer dans le cadre de cette étude.

BIBLIOGRAPHIE

TRAVAUX PERSONNELS

- [1] SÉRO-DIAGNOSTIC DE LA SYPHILIS PAR IMMOBILISATION DE *TREPONEMA PALLIDUM* (MÉTHODE DE NELSON), en collaboration avec C. Levaditi et A. Vaisman. — *C. R. Acad. Sc.*, 1951, 232, 272 et *la Prophylaxie anti-vénérienne*, 1951, 23, 59.
- [2] LE SÉRO-DIAGNOSTIC IMMUNOLOGIQUE DE LA SYPHILIS PAR IMMOBILISATION DE *TREPONEMA PALLIDUM* (MÉTHODE DE NELSON), en collaboration avec A. Vaisman. — *Bull. Acad. nat. Méd.*, 1951, 135, 132 et *la Prophylaxie antivénérienne*, 1951, 23, 77.
- [3] LE TEST D'IMMOBILISATION DE *TREPONEMA PALLIDUM* (RÉACTION DE NELSON), en collaboration avec A. Vaisman. — *La Presse médicale*, 1951, 59, 1418.
- [4] SÉPARATION DES RÉAGINES ET DES IMMOBILISINES TRÉPONÉMIQUES DES SÉRUMS PAR L'ULTRACENTRIFUGATION, en collaboration avec A. Vaisman. — *C. R. Acad. Sc.*, 1952, 234, 156.
- [5] LE TEST DE NELSON : BILAN DES RÉSULTATS OBTENUS PENDANT L'ANNÉE 1951 A L'INSTITUT ALFRED-FOURNIER, en collaboration avec A. Vaisman. — *La Semaine médicale*, 1952, 28, 415.
- [6] LES *BORRELIA DUTTONI*, DEVENUS RÉSISTANTS AUX ANTICORPS SPIRILLICIDES, SE RÉVÈLENT-ILS RÉFRACTAIRES AUX IMMOBILISINES DE NELSON ET MAYER? en collaboration avec C. Levaditi et A. Vaisman. — *Ann. Inst. Pasteur*, 1952, 83, 437.
- [7] EFFET DE L'ULTRACENTRIFUGATION SUR LA TENEUR DES SÉRUMS EN IMMOBILISINES ANTITRÉPONÉMIQUES D'UNE PART, EN AGGLUTININES ANTITYPIQUES ET EN HÉMOLYSINES ANTIMOUTON, DE L'AUTRE, en collaboration avec A. Vaisman. — *C. R. Soc. Biol.*, 1952, 146, 52.
- [8] L'ACTION DU FORMOL SUR *TREPONEMA PALLIDUM* EN RELATION AVEC SON APTITUDE A DÉCLENCHER LA PRODUCTION D'IMMOBILISINES SÉRIQUES, en collaboration avec A. Vaisman et C. Levaditi. — *C. R. Soc. Biol.*, 1952, 146, 514.
- [9] *TREPONEMA PALLIDUM* DÉVITALISÉ PAR LE RAYONNEMENT ULTRAVIOLET EST-IL UN ANTIGÈNE IMMOBILISANT? en collaboration avec A. Vaisman et C. Levaditi. — *Ann. Inst. Pasteur*, 1952, 83, 263.
- [10] *TREPONEMA PALLIDUM* DÉVITALISÉ PAR LA CHALEUR EST-IL UN ANTIGÈNE IMMOBILISANT? en collaboration avec A. Vaisman et C. Levaditi. — *C. R. Soc. Biol.*, 1952, 146, 512.
- [11] SOUS L'INFLUENCE DES IMMOBILISINES DE NELSON ET MAYER, *TREPONEMA PALLIDUM* PERD-IL SA VIRULENCE? en collaboration avec C. Levaditi et A. Vaisman. — *Ann. Inst. Pasteur*, 1952, 82, 635.
- [12] TEST DE NELSON ET MAYER. NOUVELLES RECHERCHES CLINIQUES ET EXPÉRIMENTALES, en collaboration avec C. Levaditi et A. Vaisman. — *La Presse médicale*, 1952, 60, 1231.
- [13] LES IMMOBILISINES ANTIRÉCURRENTIELLES (*BORRELIA DUTTONI*), en collaboration avec C. Levaditi et A. Vaisman. — *Ann. Inst. Pasteur*, 1952, 83, 256.
- [14] BISMUTHOTHÉRAPIE EXPÉRIMENTALE DE LA SYPHILIS ET RÉACTION DE NELSON ET MAYER, en collaboration avec C. Levaditi et A. Vaisman. — *Bull. Acad. nat. Méd.*, 1952, 136, 367.
- [15] SPÉCIFICITÉ DES IMMOBILISINES RÉCURRENTIELLES ENTRE *BORRELIA DUTTONI* ET *BORRELIA HISPANICA*, en collaboration avec A. Vaisman et C. Levaditi. — *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, 84, 774.

- [16] LE TEST DE NELSON ET MAYER (IMMOBILISINES ANTITRÉPONÉMIQUES) AU COURS DU TRAITEMENT DE LA SYPHILIS EXPÉRIMENTALE PAR LA PÉNICILLINE, en collaboration, avec C. Levaditi et A. Vaisman. — *La Presse médicale*, 1953, 61, 401.
- [17] IMMUNITÉ ET SPÉCIFICITÉ DES IMMOBILISINES RÉCURRENTIELLES ENTRE BORRELIA DUTTONI ET BORRELIA HISPANICA, en collaboration avec A. Vaisman. — *Ann. Inst. Pasteur*, 1954, 86, 107.
- [18] LE TEST D'IMMOBILISATION DES TRÉPONÈMES AU COURS DU TRAITEMENT DE LA SYPHILIS EXPÉRIMENTALE PAR L'ASSOCIATION PÉNICILLINE-BISMUTH, en collaboration avec A. Vaisman et F. Dunoyer. — *La Presse médicale*, 1954, 62, 829.
- [19] TROIS ANNÉES DE PRATIQUE DU TEST D'IMMOBILISATION DE TREPONEMA PALLIDUM (MÉTHODE DE NELSON ET MAYER), en collaboration avec A. Vaisman et H. Vaisman. — *La Presse médicale*, 1954, 62, 1074.
- [20] LA SÉROLOGIE DE LA SYPHILIS AVEC L'ANTIGÈNE TRÉPONÉMIQUE DE REITER, en collaboration avec P. Gastinel et A. Vaisman. — *Bull. Soc. fr. Dermatol. Syph.*, 1955, 62, 546.
- [21] TEST D'IMMOBILISATION DE TREPONEMA PALLIDIUM (RÉACTION DE NELSON ET MAYER), en collaboration avec A. Vaisman. — *Produits pharmaceutiques*, 1956, 11, 624.
- [22] LA PLACE DU TRÉPONÈME DE CULTURE SOUCHE REITER DANS LA SÉROLOGIE DE LA SYPHILIS, en collaboration avec P. Gastinel et A. Vaisman. — *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, 90, 249.
- [23] L'ANTIGÈNE TRÉPONÉMIQUE DE REITER DANS LE SÉRO-DIAGNOSTIC DE LA SYPHILIS, en collaboration avec A. Vaisman. — *La Presse médicale*, 1956, 64, 1229 et *La Prophylaxie antivenérienne*, 1956, 28, 208.
- [24] VALEUR ANTIGÉNIQUE DE TREPONEMA PALLIDUM SOUMIS AUX ULTRASONS DANS LE SÉRO-DIAGNOSTIC DE LA SYPHILIS, en collaboration avec A. Vaisman et R. Prudhomme. — *C. R. Acad. Sc.*, 1957, 244, 2750.
- [25] DE L'EMPLOI DES ANTIGÈNES DU TRÉPONÈME REITER DANS LA SÉROLOGIE DE LA SYPHILIS ET DANS L'ÉTUDE DES PHÉNOMÈNES DE SENSIBILISATION ALLERGIQUE, en collaboration avec P. Gastinel, A. Vaisman et F. Dunoyer. — *Ann. Dermatol. Syph.*, 1957, 84, 153.
- [26] LE TEST DE NELSON (INDICATIONS CLINIQUES), en collaboration avec A. Vaisman, L. Ledemoulin-Brahy, L. Van der Meiren et A. Delmotte. — *Acta Clinica Belgica*, 1958, 13, 51.
- [27] LES ANTIGÈNES TRÉPONÉMIQUES DANS LE SÉRO-DIAGNOSTIC DE LA SYPHILIS, en collaboration avec A. Vaisman. — *La Presse médicale*, 1958, 66, 1357 et *La Prophylaxie antivenérienne*, 1958, 30, 232.
- [28] UTILISATION DE TREPONEMA PALLIDUM PATHOGÈNE EN TANT QU'ANTIGÈNE POUR RÉACTION DE FIXATION DE COMPLÉMENT, en collaboration avec A. Vaisman et R. Prudhomme. — *Ann. Dermatol. Syph.*, 1958, 85, 642.

AUTEURS CONSULTÉS

- [29] E. METCHNIKOFF et E. ROUX. — *Ann. Inst. Pasteur*, 1903, 17, 808.
- [30] E. SCHAUDINN et E. HOFFMANN. — *Arb. a. d. kaiserl. Gesundheitsamte*, 1905, 22, 527; *Deutsche Med. Wochenschr.*, 1905, 18, 711.
- [31] K. LANDSTEINER et V. MUCHA. — *Wien. Klin. Wchn.*, 1906, 19, 1349.
- [32] E. HOFFMANN. — *Berlin. Klin. Wchn.*, 1907, 12, 351.
- [33] A. WASSERMANN, A. NEISSER et C. BRUCK. — *Deutsche Med. Wochenschr.*, 1906, 19, 745.
- [34] C. LEVADITI et A. MARIE. — *Ann. Inst. Pasteur*, 1907, 21, 138.
- [35] K. LANDSTEINER, R. MULLER et O. POTZL. — *Wien. Klin. Wchn.*, 1907, 20, 1565.

- [36] C. LEVADITI et I. YAMANOUCHI, *C. R. Soc. Biol.*, 1907, **63**, 740.
- [37] H. NOGUCHI. — *J. A. M. A.*, 1912, **58**, 1163.
- [38] C. F. CRAIG et H. J. NICHOLS. — *J. Exper. Med.*, 1912, **16**, 336.
- [39] J. A. KOLMER, W. W. WILLIAMS et E. E. LAUBAUGH. — *J. Med. Res.*, 1913, **28**, 345.
- [40] W. GAETGENS. — *Med. Klin.*, 1929, **25**, 390.
- [41] D'ALESSANDRO et coll. — *Bull. Soc. It. Biol. Spec.*, 1941, **16**, 469.
- [42] K. LANDSTEINER et V. MUCHA. — *Verhandl. d. Wien. Dermatolog. Gesellsch.*, 1907, 9 janvier.
- [43] A. LÉVY-BING. — *Le Micro-organisme de la syphilis*, O. Douin, éditeur, 1907, 268 pages.
- [44] C. LEVADITI et A. MARIE. — *C. R. Soc. Biol.*, 1907, **62**, 872.
- [45] A. TOURAINE. — *Les Anticorps syphilitiques. Essais de séro-agglutination de la syphilis* (Thèse de médecine), Paris 1912, G. Steinheil, éditeur.
- [46] R. A. NELSON et MM. MAYER. — *J. Exper. Med.*, 1949, **89**, 369.
- [47] H. J. MAGNUSON et F. A. THOMPSON. — *J. Ven. Dis. Inf.*, 1949, **30**, 309.
- [48] A. SAUSSE. — *Ann. Biol. Clin.*, 1951, **9**, 490.
- [49] H. J. NICHOLS et W. H. HOUGH. — *J. A. M. A.*, 1913, **60**, 108.
- [50] L. J. BOREL. — *C. R. Soc. Biol.*, 1952, **146**, 32.
- [51] F. W. CHORPENNING, R. W. SANDERS et J. F. KENT. — *Amer. J. Syph. Gonorr. Ven. Dis.*, 1952, **36**, 401.
- [52] A. FRIBOURG-BLANC. — *Ann. Derm. Syph.*, 1957, **84**, 286.
- [53] G. AJELLO, J. PORTNOY, L. LOGAN et S. OLANSKY. — *Amer. J. Syph. Gonorr. Ven. Dis.*, 1954, **38**, 288.
- [54] K. MEINICKE. — *Des Hautarzt.*, 1953, **4**, 268.
- [55] R. A. MELSON et J. A. DIESENDRUCK. — *J. Immunol.*, 1951, **66**, 667.
- [56] W. B. ROBERTSON. — *Science*, 1942, **96**, 93.
- [57] J. PORTNOY, A. HARRIS et S. OLANSKY. — *Amer. J. Syph. Gonorr. Ven. Dis.*, 1953, **37**, 101.
- [58] F. A. H. RICE et R. A. NELSON. — *J. Biol. Chem.*, 1951, **191**, 35.
- [59] R. A. NELSON. — *Le T. P. I. — Test de Nelson et Mayer et les nouveaux aspects immunologiques de la syphilis*. — 1953, p. 87, Masson, éditeur, Paris.
- [60] J. RANQUE, J. B. MOIGNOUX et R. DEPIEDS. — *C. R. Soc. Biol.*, 1952, **146**, 1224.
- [61] R. A. BOAK et J. N. MILLER. — *Amer. J. Syph. Gonorr. Ven. Dis.*, 1954, **38**, 429.
- [62] J. DELACRETAZ. — *Ann. Derm. Syph.*, 1953, **80**, 501.
- [63] R. K. LEDBETTER et V. E. MARTENS. — *The treponemal pallidum immobilization test*, 1956, bureau of Medicine and Surgery, Navy Department, Bethesda-Md.
- [64] J. RANQUE et R. DEPIEDS. — *C. R. Soc. Biol.*, 1957, **151**, 1404.
- [65] J. RANQUE et J. B. MOIGNOUX. — *C. R. Soc. Biol.*, 1952, **146**, 1762.
- [66] V. DEUTSCH et I. LOMINSKI. — *Bull. Acad. nat. Med.*, 1937, **118**, 220.
- [67] M. PAIC. — *C. R. Acad. Sc.*, 1938, **207**, 1074.
- [68] A. S. KHAN, R. A. NELSON et T. B. TURNER. — *Amer. J. Hyg.*, 1951, **53**, 296.
- [69] J. G. SAWTCHENKO. — *Ann. Inst. Pasteur*, 1902, **16**, 106.
- [70] C. LEVADITI et J. ROCHE. — *C. R. Soc. Biol.*, 1907, **62**, 619 et 815.
- [71] L. BAILLIE, N. T. CONSTANTINESCO et M. CHELARESCO. — *Bull. Acad. Med. Roumanie*, 1946, **19**, 572.
- [72] J. RANQUE, R. DEPIEDS et R. M. NICOLI. — *Bull. Soc. Path. exot.*, 1955, **48**, 326.

- [73] J. RANQUE, R. DEPIEDS et A. FAURE. — *Bull. Soc. Path. exot.*, 1957, 50, 360.
- [74] C. LEVADITI et S. MUTERMILCH. — *Zeitschr. Immunitätsf.*, 1909, 3, 702.
- [75] C. LEVADITI et MCINTOSCH. — *Bull. Soc. Path. exot.*, 1910, 3, 368.
- [76] T. B. TURNER. — *J. Exp. Med.*, 1939, 69, 867.
- [77] H. J. MAGNUSON, H. EAGLE et R. FLEISCHMAN. — *Ann. J. Syph. Gonor. Ven. Dis.*, 1948, 32, 1.
- [78] A. F. THOMPSON, B. G. GREENBERG et H. J. MAGNUSON. — *J. of Bact.*, 1950, 60, 473.
- [79] C. LEVADITI, A. VAISMAN et M. PAIC. — *C. R. Soc. Biol.*, 1934, 117, 357.
- [80] H. EAGLE et R. FLEISCHMANN. — *J. Exp. Med.*, 1948, 87, 369.
- [81] Ch. P. MCLEOD et H. J. MAGNUSON. — *Amer. J. Syph. Gonor. Ven. Dis.*, 1953, 37, 9. — *J. Ven. Dis. Inform.*, 1931, 32, 274.
- [82] P. GASTINEL, P. COLLART et J. L. BOREL. — *Bull. Soc. Dermato. Syph.*, 1951, 58, 551. — *Ann. Inst. Pasteur*, 1952, 83, 254.
- [83] P. GASTINEL, P. COLLART, A. SAUSSE et J. L. BOREL. — *Bull. Soc. fr. Dermato. Syph.*, 1952, 59, 50.
- [84] G. W. WARING et W. L. FLEMING. — *Amer. J. Syph. Gonor. Ven. Dis.*, 1951, 35, 568.
- [85] F. S. JONES. — *J. Exp. Med.*, 1927, 46, 291.
- [86] J. R. MARRACK. — *The Chemistry of Antigens and Antibodies*, London, His Majesty's Stationary Office, 1938.
- [87] A. HARRIS, J. PORTNOY, V. H. FALCONE, S. OLANSKY. — *Amer. J. Syph. Gonor. Ven. Dis.*, 1953, 37, 106.
- [88] L. E. BARON. — *Recent advances in the Study of venereal diseases*, Washington, 1951, Paper n° 37.
- [89] A. B. LAURELL. — *Acta Path. et Microbiol. Scandinav.*, 1955, suppl. 103, et A. B. LAURELL et A. LERIDAN, *ibidem*, 1958, 42, 67.
- [90] J. RANQUE, R. DEPIEDS et J. B. MOIGNOUX. — *C. R. Soc. Biol.*, 1952, 146, 1226.
- [91] R. A. NELSON et J. A. DIESENDRUCK. — *J. Immunol.*, 1951, 66, 667.
- [92] T. B. TURNER et D. H. HOLLANDER. — *Amer. J. Syph. Gonor. Ven. Dis.*, 1954, 38, 371.
- [93] R. A. NELSON. — *La Presse médicale*, 1952, 60, 1719.
- [94] C. LEVADITI et A. VAISMAN. — *Bull. Acad. nat. Méd.*, 1946, 130, 30.
- [95] P. GASTINEL et P. COLLART. — *Ann. Dermato. Syph.*, 1956, 83, 5.
- [96] C. LEVADITI et A. VAISMAN. — *La Presse médicale*, 1950, 58, 1397.
- [97] C. LEVADITI et A. VAISMAN. — *Bruxelles médical*, 1951, 31, 1971.
- [98] R. A. NELSON. — *Brit. J. Vener. Dis.*, 1952, 28, 160.
- [99] R. A. NELSON. — *La Presse médicale*, 1952, 60, 1719.
- [100] R. KOURILSKY, R. PIÉRON et R. RICHOU. — *C.R. Acad. Sc.*, 1957, 244, 957.
- [101] R. A. NELSON. — *Science*, 1953, 118, 733.
- [102] R. ROBINEAUX et R. A. NELSON. — *C. R. Soc. Biol.*, 1955, 149, 489.
- [103] Ch. R. REIN et L. C. KELCEC. — *Amer. J. Clin. Path.*, 1957, 28, 417.
- [104] G. L. DAGUET. — *Bull. Org. mond. Santé*, 1956, 14, 303.
- [105] G. L. DAGUET. — *Brit. J. Ven. Dis.*, 1956, 32, 96.
- [106] E. HOFFMANN. — *Dermat. Z.*, 1906, 13, 561.
- [107] D. ZABOLOTNY et MASLAKOWETZ. — *Centr. Bakt.*, 1 abt., Orig., 1907, 44, 532.
- [108] T. TANI. — *Jap. J. Exp. Med.*, 1940, 18, 11.
- [109] T. TANI et O. ASANO. — *Jap. Med. J.*, 1951, 4, 51.
- [110] R. M. CAIN. — *Canad. J. Publ. Health*, 1953, 44, 61.

- [111] Ch. P. McLEOD et H. J. MAGNUSON. — *Publ. Hlth Rep.*, 1953, 68, 747.
- [112] Ch. P. McLEOD et P. S. STOKES. — *Publ. Hlth Rep.*, 1955, 70, 379.
- [113] P. H. HARDY et E. E. NELL. — *J. Exp. Med.*, 1955, 101, 367.
- [114] H. J. MAGNUSON et Ch. P. McLEOD. — *Bull. Org. mond. Santé*, 1956, 14, 289.
- [115] P. H. HARDY et E. E. NELL. — *Amer. J. Hyg.*, 1957, 66, 160.
- [116] H. NOGUCHI. — *J. Exp. Med.*, 1911, 14, 99.
- [117] H. NOGUCHI. — *J.A.M.A.*, 1912, 58, 1163.
- [118] W. GAETGENS. — *Z. Immunit. Forsch.*, 1929, 63, 398.
- [119] W. GAETGENS et A. OTTO. — *Med. Klin.*, 1929, 25, 873.
- [120] A. BECK. — *J. of Hyg.*, 1939, 39, 298.
- [121] H. EAGLE et R. B. HOGAN. — *J. Exp. Med.*, 1940, 71, 215.
- [122] G. D'ALESSANDRO et R. DE BLASI. — *Boll. Soc. it. Biol. sper.*, 1941, 16, 469.
- [123] G. D'ALESSANDRO et V. A. PUCCINELLI. — *Giorn. Med.*, 1944, 1, 68.
- [124] J. A. KOLMER, C. C. KAST et E. R. LYNCH. — *Am. J. Syph. Gonor. Ven. Dis.*, 1941, 25, 300.
- [125] J. A. KOLMER, C. C. KAST et E. R. LYNCH. — *Am. J. Syph. Gonor. Ven. Dis.*, 1941, 25, 412.
- [126] J. A. KOLMER. — *Arch. Dermat. and Syph.*, 1942, 45, 455.
- [127] H. BROTTES. — *Thèse médecine*, Lyon 1954.
- [128] R. PAUTRIZEL, F. SZERSNOVICZ et A. GIMENEZ. — *Bull. Soc. fr. Derm. Syph.*, 1953, 60, 395.
- [129] R. SOHIER, F. BÉNAZET, H. BROTTES et J. THIVOLET. — *Rev. lyon. Méd.*, 1954, 3, 749.
- [130] N. HARDY, G. BORNAND et P. DUREL. — *Bull. Soc. fr. Derm. Syph.*, 1955, 62, 55.
- [131] I. MUSTER. — *Dermatologica*, 1942, 86, 351.
- [132] A. WASSERMANN et M. FICKER. — *Klin. Woch.*, 1922, 1, 1101.
- [133] H. REITER. — *Klin. Woch.*, 1926, 5, 144.
- [134] H. REITER. — *Dermat. Woch.*, 1926, 83, 1199.
- [135] H. EAGLE et F. G. GERMUTH. — *J. of Immunol.*, 1948, 60, 223.
- [136] A. GELPERIN. — *Am. J. Syph. Gonor. Ven. Dis.*, 1949, 33, 101.
- [137] N. R. ROSE et H. E. MORTON. — *Am. J. Syph. Gonor. Ven. Dis.*, 1952, 36, 1.
- [138] R. PAUTRIZEL, R. F. BONNARDOT et F. SZERSNOVICZ. — *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, 92, 586.
- [139] R. F. BONNARDOT. — *Thèse médecine*, Bordeaux 1955, n° 247, E. Drouillard, éditeur.
- [140] G. D'ALESSANDRO et L. DARDANONI. — *Amer. J. Syph. Gonor. Ven. Dis.*, 1953, 37, 137.
- [141] I. PISU et L. MASTROMATTEO. — *Riv. Ist. Sieroterap. ital.*, 1955, 30, 123.
- [142] G. LARTIGAU. — *Thèse médecine*, Lyon, 1955, n° 303, C. Annequin, éditeur.
- [143] J. A. KOLMER, C. C. KAST et E. R. LYNCH. — *Amer. J. Syph. Gonor. Ven. Dis.*, 1941, 25, 412.
- [144] G. D'ALESSANDRO, F. ODDO, R. COMES et L. DARDANONI. — *Riv. Ist. Sieroterap. ital.*, 1949, 24, 134.
- [145] T. GRUNEBERG. — *Dermat. Woch.*, 1934, 99, 1330.
- [146] G. D'ALESSANDRO et L. DARDANONI. — *Riv. Ist. Sieroterap. ital.*, 1952, 27, 153.
- [147] V. A. PUCCINELLI et A. G. BELLONE. — *Giorn. ital. Derm. e Sifil.*, 1949, 90, 362.
- [148] G. D'ALESSANDRO et C. DEL CARPIO. — *Nature*, 1958, 181, 991.

- [149] H. SACHS, A. KLOPSTOCK et A. J. WEIL. — *Deut. Med. Woch.*, 1925, 51, 589.
- [150] J. PORTNOY et H. J. MAGNUSON. — *J. of Immunol.*, 1955, 75, 348.
- [151] H. J. MAGNUSON et J. PORTNOY. — *Am. J. Publ. Hlth*, 1956, 46, 190.
- [152] J. PORTNOY et H. J. MAGNUSON. — *Am. J. Clin. Path.*, 1956, 26, 313.
- [153] M. D. SCHNEIDER. — *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.*, 1953, 82, 655.
- [154] M. D. SCHNEIDER. — *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.*, 1954, 85, 32.
- [155] W. GARSON et J. PORTNOY. — *Publ. Heth. Lab.*, 1957, 15, n° 3.
- [156] I. N. ORPWOOD PRICE. — *Brit. J. Ven. Dis.*, 1957, 33, 18.
- [157] L. DARDANONI et S. CENSUALES. — *Riv. Ist. Sieroterap. ital.*, 1957, 32, 489.
- [158] JADASSOHN. — *Arch. für Derm. und Syph.*, 1907, 84, 85.
- [159] TEDESCHI. — *Gaz. Osp.*, 1908, 29, 620.
- [160] CIUFFO. — *Giorn. ital. Mal. Ven. Pell.*, 1909, 44, 170.
- [161] NOBL, FLUSS. — *Wien. Klin. Woch.*, 1912, 25, 475.
- [162] A. NEISSER et C. BRUCK. — *Beiträge für Pathologie und Therapie der Syphilis*, 1911.
- [163] MEIROWSKY. — *Arch. für Dermat. und Syph.*, 1909, 94, 335.
- [164] NICOLAS, FAVRE, GAUTHIER et CHARLET. — *Lyon med.*, 1910, 114, 621 et 624.
- [165] FONTANA. — *Gaz. Osp.*, 1911, 32, 1259.
- [166] GAVINI. — *Congr. intern. Derm.*, Rome, 1912.
- [167] FISCHER, et KLAUSSNER. — *Wien. Klin. Woch.*, 1913, 26, 49.
- [168] J. SCHERECHEWSKY. — *Deutsche Med. Woch.*, 1909, 35, 835 et 1260.
- [169] H. NOGUCHI. — *J. Exp. Med.*, 1911, 14, 557.
- [170] H. NOGUCHI. — *La Presse médicale*, 1913, 21, 757.
- [171] R. DEGOS. — *Bull. Soc. fr. Derm. Syph.*, 1941, 48, 376.
- [172] J. CHARPY, J. RANQUE et G. TRAMIER. — *Bull. Soc. fr. Derm. Syph.*, 1957, 64, 18.
- [173] D'après G. L. DAGUET, *III^e Colloque de la filiale marseillaise de la Soc. de Derm. et Syph.*, Masson, éditeur, 1953.
-

TABLE DES MATIÈRES

PLAN DU TRAVAIL.....	1
INTRODUCTION	3

PREMIÈRE PARTIE

LE TEST D'IMMOBILISATION DES TRÉPONÈMES

CHAPITRE PREMIER

PRINCIPE, TECHNIQUE ET ÉTUDES DES DIVERS ÉLÉMENTS DE LA RÉACTION

I. PRINCIPE	8
II. TECHNIQUE.....	8
A. Suspension tréponémique.....	8
B. Sérums à examiner.....	9
C. Complément	9
D. Réaction proprement dite.....	10
E. Lecture.....	10
F. Réactions quantitatives	15
III. ÉTUDES DES DIVERS ÉLÉMENTS DE LA RÉACTION.....	16
A. Préparation de la suspension tréponémique.....	16
1° <i>Inoculation des lapins</i>	16
2° <i>Prélèvement de l'orchite, source de tréponèmes</i>	19
B. Préparation du milieu de survie.....	21
1° <i>Milieu normal</i>	21
2° <i>Études portant sur les divers composants du milieu</i>	23
3° <i>Études des divers milieux de remplacement</i>	26
C. Prélèvement et conservation des sérums et autres liquides à examiner	30
1° <i>Sérums</i>	30
2° <i>Liquide céphalo-rachidien</i>	31
3° <i>Autres liquides biologiques</i>	31
D. Le complément	31
1° <i>Préparation</i>	31
2° <i>Titrages</i>	31
3° <i>Contrôle du complément résiduel</i>	34
E. Mélange gazeux	35

CHAPITRE II

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE DE LA RÉACTION

I. LES ANTICORPS IMMOBILISANTS.....	36
A. Différenciation des immobilisines et de la réagine.....	36
1° <i>Méthode d'absorption de NELSON et MAYER</i>	37
2° <i>Procédé personnel : méthode physique d'ultra-centrifugation</i>	39
B. Différenciation entre les immobilisines de la syphilis et celles des autres spirochétoses	42
1° <i>Treponema pallidum, pertenue et cuniculi</i>	43
2° <i>Tréponèmes pâles pathogènes et tréponèmes de culture</i> ...	44
3° <i>Les immobilisines dans les spirochétoses récurrentielles</i>	45
C. Pouvoir tréponémicide de l'anticorps immobilisant.....	50
D. Nature de l'anticorps immobilisant	53
1° <i>Mode de production de l'immobilisine</i>	53
2° <i>Thermostabilité</i>	59
3° <i>Comportement de l'immobilisine dans les fractionnements protéiniques</i>	61
II. CINÉTIQUE DE LA RÉACTION D'IMMOBILISATION.....	62
A. Variation de l'immobilisation en fonction du temps d'incubation	62
B. Influence de la température d'incubation sur la vitesse de l'immobilisation	64
C. Rôle du complément sur l'immobilisation des tréponèmes.....	65
1° <i>Nécessité du complément</i>	65
2° <i>Influence de la concentration en complément</i>	65
III. PRÉVENTION DE LA SENSIBILISATION DES TRÉPONÈMES <i>in vivo</i> EN VUE DE LA PRÉPARATION DE LA SUSPENSION ANTIGÉNIQUE DE TRÉPONÈMES	70
A. Emploi de la moutarde azotée.....	70
B. Utilisation de la cortisone	71
C. Irradiation par les rayons X.....	71
DISCUSSION ET CONCLUSION.....	71

CHAPITRE III

LE TEST D'IMMOBILISATION DES TRÉPONÈMES
EN SYPHILIS EXPÉRIMENTALE ET EN CLINIQUE HUMAINE

I. LE T.P.I. CHEZ LES ANIMAUX RÉCEPTIFS A LA SYPHILIS.....	73
A. Lapins	73
B. Souris	73
C. Rats	73
D. Cobayes	73
E. Hamsters	73
II. IMMOBILISINES ET CHIMIOTHÉRAPIE EN SYPHILIS EXPÉRIMENTALE..	74
A. Bismuthothérapie	74
B. Pénicillinothérapie.....	74
C. Association pénicilline-bismuth	74

III. ÉTUDE CLINIQUE.....	78
A. Syphilis primo-secondaire.....	78
1° <i>Syphilis primaire présérologique</i>	78
2° <i>Syphilis primo-secondaire à B.W. positif avant le traitement</i>	78
B. Syphilis tertiaire	78
C. Syphilis nerveuse	79
1° <i>Paralysie générale</i>	79
2° <i>Tabès</i>	79
D. Syphilis congénitale.....	79
E. Syphilis sérologique asymptomatique.....	79
F. Réactions faussement positives	79
G. Syphilis insuffisamment ou irrégulièrement traitées.....	80
H. Rechutes clinique et sérologique.....	80
I. B.W. irréductible	80
J. Réinfection	80
CONCLUSION.....	80

DEUXIÈME PARTIE

LES AUTRES RÉACTIONS UTILISANT DES ANTIGÈNES TRÉPONÉMIQUES

CHAPITRE IV

LA RÉACTION D'ADHÉRENCE-DISPARITION DES TRÉPONÈMES

I. PRINCIPE DE LA RÉACTION.....	84
II. TECHNIQUE DE LA RÉACTION	86
A. Préparation des réactifs	86
1° <i>Sérum à examiner</i>	86
2° <i>Suspension de tréponème-antigène</i>	87
3° <i>Solution de HANKS</i>	87
4° <i>Hématies humaines</i>	87
5° <i>Complément</i>	87
B. Réaction proprement dite.....	87
C. Lecture.....	88
1° <i>Témoin de série</i>	88
2° <i>Réaction</i>	88
III. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS	89
IV. TEST D'HÉMAGGLUTINATION	89
CONCLUSION.....	90

CHAPITRE V

LES RÉACTIONS D'AGGLUTINATION DES TRÉPONÈMES

I. PRINCIPE	91
II. HISTORIQUE	91
III. TECHNIQUES ACTUELLES	91
A. Technique d'agglutination de TANI	92
B. Technique de CAIN	92
C. Technique McLEOD et MAGNUSON	92
D. Technique de HARDY et NELL	93
DISCUSSION	95
CONCLUSION	97

CHAPITRE VI

LES ANTIGÈNES TRÉPONÉMIQUES
FOURNIS PAR LA SOUCHE REITER

I. HISTORIQUE	99
II. PRÉPARATION DES ANTIGÈNES	100
A. Suspensions brutes de corps spirochéliens	102
B. Antigènes obtenus par cryolyse	103
C. Antigène ultra-soné	103
D. Extrait protéique (A.T.P.S.)	103
III. TECHNIQUE DE LA RÉACTION	105
A. Titrage de l'antigène	105
B. Titrage du système hémolytique	105
C. Réaction proprement dite	105
IV. RÉSULTATS	106
V. ÉTUDE EXPÉRIMENTALE	107
A. Évolution des anticorps antitréponémiques au cours de la syphilis expérimentale du lapin	107
B. Comportement du lapin neuf vis-à-vis d'injections de tréponèmes REITER	108
C. Séparation des divers anticorps vis-à-vis des antigènes homologues	108
D. Fractionnement antigénique des tréponèmes Reiter	109
1 ^o Fraction protidique	109
2 ^o Fraction polysaccharidique	110
3 ^o Fraction lipidique	111
E. Recherche de l'état de sensibilisation chez l'homme et chez l'animal	111
1 ^o Réponse des sujets humains syphilitiques à l'intradermo-réaction avec la fraction protidique du REITER	111
2 ^o Recherche de la sensibilisation des lapins syphilisés vis-à-vis des antigènes du tréponème REITER	112
3 ^o État de sensibilisation des lapins préparés par injections répétées de suspensions de tréponèmes de culture	113
CONCLUSION	114

CHAPITRE VII

UTILISATION DE *Treponema pallidum* PATHOGÈNE EN TANT QU'ANTIGÈNE POUR RÉACTION DE FIXATION DE COMPLÉMENT

I. TECHNIQUE DE PORTNOY et MAGNUSON.....	115
A. Préparation de l'antigène	115
B. Technique de fixation du complément	117
C. Résultats.....	117
D. Discussion.....	119
II. TECHNIQUE DE VAISMAN, HAMELIN ET PRUDHOMME.....	120
A. Préparation de l'antigène NICHOLS ultra-soné.....	120
B. Réaction proprement dite.....	120
C. Résultats.....	121
D. Discussion.....	123
III. TECHNIQUE DE ORPWOOD PRICE ET WHELAN.....	124
A. Préparation de l'antigène	124
B. Résultats.....	125
IV. TECHNIQUE DE DARDANONI ET CENSUALES.....	125
A. Préparation de l'antigène protéique de <i>T. pallidum</i>	125
B. Résultats.....	126

CHAPITRE VIII

LES TESTS CUTANÉS DANS LE DIAGNOSTIC DE LA SYPHILIS

LUO-TEST

<i>Historique</i>	127
I. ANTIGÈNES PRÉPARÉS A PARTIR DE FETUS HÉRÉDO-SYPHILITIQUE OU DE LÉSIONS DE SYPHILIS ACQUISE.....	127
II. ANTIGÈNES PRÉPARÉS A PARTIR DE SPIROCHÈTES DE CULTURE.....	128
III. ANTIGÈNE PURIFIÉ PRÉPARÉ A PARTIR DE <i>Treponema pallidum</i> PATHOGÈNE-LUÉTINE	129
A. Préparation de la luétine purifiée.....	129
B. Technique du luo-test	130
C. Résultats.....	130
DISCUSSION.....	131
CONCLUSION.....	132
CONCLUSIONS GÉNÉRALES.....	133
BIBLIOGRAPHIE.....	137
I. Travaux personnels	137
II. Auteurs consultés.....	138

ACHEVÉ D'IMPRIMER
SUR LES PRESSES DE
L'IMPRIMERIE NOUVELLE
53, QUAI DE LA SEINE, PARIS
LE 22 JUILLET 1959 - N° 197

N° de l'éditeur : 140
Dépôt légal : 3^e trimestre 1959

